

# Funktionelle Bedeutung von Hämoxygenase-1 und Kohlenmonoxid für circadiane Oszillatoren

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Herr Dipl.-Biol. Roman Klemz  
geboren am 24. Juni 1974 in Witten

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk
2. Prof. Dr. rer. nat. Peter-Michael Kloetzel
3. PD Dr. med. Johann Pratschke

eingereicht am: 04. Februar 2009  
Tag der mündlichen Prüfung: 04. September 2009



## Zusammenfassung

Hämoxygenasen (HO) katalysieren unter der Aufnahme von molekularem Sauerstoff und der Freisetzung von Kohlenmonoxid (CO) und Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) die Oxidation von Häm zu Biliverdin. HO-1, eine induzierbare Isoform der HO, wird durch ihre Aktivität mit zellschützenden, antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften in Verbindung gebracht. Dabei gilt insbesondere das CO als Mediator dieser Eigenschaften. Die molekularen Wechselwirkungen und genregulatorischen Funktionen von CO sind allerdings noch weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurden mittels cDNA Microarray-Technologie Gene identifiziert, die in der murinen Leber nach Inhalation von CO oder nach pharmakologischer Induktion von mHO-1 eine differentielle Expression der mRNA aufwiesen. Diese Gene konnten in einen Zusammenhang mit der circadianen Uhr gebracht werden und führten zu der Hypothese, dass CO einen direkten Einfluss auf den molekularen Oszillator der Inneren Uhr hat. Dies konnte in primären Hepatozyten durch eine veränderte circadiane Expression der essentiellen Uhrgene *mPer2* und *mRev-erba* nach CO-Behandlung bestätigt werden. Weiterhin wurde für *mHo-1* eine, bisher unbekannte, circadian regulierte Genexpression in primären Hepatozyten und der murinen Leber gezeigt. Es konnte die Funktionalität einer spezieübergreifend, konservierten E-Box im Promotor von *mHo-1* nachgewiesen werden, die diese Regulation initiieren kann. Die Messung einer ebenfalls circadian regulierten Aktivität von mHO-1, konnte durch die Etablierung einer neuartigen Fluoreszenz-basierten Methode durchgeführt werden. Bezüglich der circadianen Oszillation von essentiellen Komponenten der circadianen Uhr zeigten *mHo-1*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten eine veränderte Genexpression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine enge Kopplung des Häm-Metabolismus mit der circadianen Uhr, die in einem Modell zusammengefasst werden konnten. HO-1 scheint dabei in diesem regulativen Netzwerk eine funktionale Rolle zu spielen. Einerseits könnte diese Verbindung eine weitere Kommunikation der circadianen Uhr mit metabolischen Prozessen darstellen und bietet andererseits eine neue Sichtweise bezüglich der Aufklärung der zellschützenden Eigenschaften von HO-1.

### Schlagwörter:

Hämoxygenase, Kohlenmonoxid, Circadiane Uhr, Hepatozyten

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Häm-Hämoxygenasesystem . . . . .	3
1.1.1 Häm . . . . .	4
Häm katabolismus . . . . .	4
Hämsynthese . . . . .	5
Hämpool . . . . .	6
Regulatorische Eigenschaften von Häm . . . . .	6
1.1.2 Hämoxygenase-1 . . . . .	7
Promotor und Induktion von HO-1 . . . . .	8
HO-1 vermittelter Zellschutz . . . . .	9
1.1.3 CO als Signalmolekül . . . . .	10
1.1.4 Messung der Aktivität von HO . . . . .	12
Fluoreszenz von Bilirubin . . . . .	14
1.2 Zusammenhang des Hämstoffwechsels mit der circadianen Uhr . . . . .	15
1.2.1 Die circadiane Uhr der Mammalia . . . . .	15
Genregulatorische Rückkopplungsschleifen bilden molekulare Uhren . . . . .	16
Interaktion der circadianen Uhr mit dem Häm-Hämoxygenase- system . . . . .	17
1.3 Zielstellung . . . . .	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Mäusestämme . . . . .	22
2.2 Isolation primärer Zellen . . . . .	22
2.2.1 Isolation muriner Hepatozyten . . . . .	22
2.2.2 Isolation muriner Fibroblasten . . . . .	24
2.3 Untersuchungen der Genexpression . . . . .	24
2.3.1 RNA-Isolation . . . . .	24
2.3.2 cDNA-Synthese für Real-Time RT-PCR . . . . .	25

2.3.3	Real-Time RT-PCR . . . . .	26
2.3.4	cDNA Micro-Array . . . . .	26
2.4	Messung der Hämoxxygenaseaktivität . . . . .	27
2.4.1	Klonierung und Darstellung von rekombinanter Biliverdinreduktase und Hämoxxygenase-1 . . . . .	27
2.4.2	Messung der Aktivität rekombinanter BVR mittels Absorbanz . . . . .	28
2.4.3	Messung der HO-Aktivität mittels Fluoreszenz . . . . .	28
2.4.4	HO-1 Induktion in RAW-Zellen und Messung der HO-Aktivität mittels Absorbanz . . . . .	29
2.5	Begasung mit Kohlenstoffmonooxid . . . . .	30
2.5.1	Dekonvolution von Hämoglobinspektren . . . . .	31
2.6	Isolierung und Behandlung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) . . . . .	32
2.6.1	Anreicherung von CD3-positiven Zellen aus PBMCs . . . . .	32
2.7	Luziferase Reporter Assay . . . . .	33
2.7.1	Klonierung des <i>mHo-1</i> Promotors . . . . .	34
2.7.2	Mutagenese der E-Box im HO-1 Promotor . . . . .	34
2.7.3	Transiente Transfektion und Transaktivierungs-Assay . . . . .	35
2.8	Statistik . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Teil I der Ergebnisse . . . . .	38
3.1.1	cDNA-Synthesen mit unterschiedlichen Primern . . . . .	39
3.1.2	Vereinfachte Methode zur Präparation primärer muriner Hepatozyten . . . . .	41
3.1.3	Etablierung einer Apparatur zur Begasung von Zellkulturen mit Kohlenmonoxid . . . . .	42
	Beschreibung der CO Begasungsanlage . . . . .	42
	CO-Begasung ist nach einer Stunde im Equilibrium . . . . .	44
3.1.4	Echtzeit-Messung der HO Aktivität mittels Fluoreszenz von gebildetem Bilirubin . . . . .	46
	Rekombinante Biliverdinreduktase . . . . .	46
	Fluoreszenz zur Detektion von Bilirubin . . . . .	48
	Fluoreszenz-basierte Messung der Aktivität von rekombinanter HO-1 . . . . .	48
	HO-Aktivität in Zell- und Organlysaten – Sensitivität und Vergleich zu einer klassischen Methode. . . . .	51
3.2	Teil II der Ergebnisse . . . . .	55
3.2.1	Genexpressionanalyse zur Identifizierung der genregulatorischen Signalwirkung von CO . . . . .	55
3.2.2	Einfluss von CO auf die Genexpression in primären Hepatozyten . . . . .	58
	CO beeinflusst die Genexpression von essentiellen Uhrgenen . . . . .	60
3.2.3	Induktion von HO-1 in primären Hepatozyten . . . . .	60

<i>Ho-1</i> ist in der Leber circadian reguliert . . . . .	61
Der Promotor von <i>mHo-1</i> besitzt eine funktionale E-Box . . .	63
3.2.4 Primäre Fibroblasten aus <i>Ho-1</i> -Knockout-Mäusen zeigen eine differentielle Genexpression . . . . .	66
<b>4 Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1 Genexpressionsanalyse im Lebermodell der Maus . . . . .	70
4.2 CO-Begasung von primären Hepatozyten . . . . .	71
4.3 Induktion von HO-1 . . . . .	73
4.3.1 Circadiane Regulation von HO-1 . . . . .	73
Echtzeit-Messung der HO Aktivität mittels Fluoreszenz von gebildetem Bilirubin . . . . .	75
4.4 Die circadiane Uhr bei Funktionsverlust von <i>mHo-1</i> in Fibroblasten .	77
4.5 Erweitertes Modell der Interaktion des Häm-Metabolismus mit der circadianen Uhr . . . . .	79
4.6 Ausblick . . . . .	81
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>A Verwendete Materialien</b>	<b>97</b>
A.1 Verwendete Materialien . . . . .	97
<b>B Bakterielle Expressionsplasmide</b>	<b>99</b>
B.1 Expressionsplasmid für rekombinante Ratten BVR . . . . .	99
B.1.1 Vektorkarte pASK-IBA6-rBVR . . . . .	99
B.1.2 Sequenz pASK-IBA6-rBVR . . . . .	99
B.2 Expressionsplasmid für rekombinante verkürzte humane HO-1 . . . .	102
B.2.1 Vektorkarte pASK-IBA6-hHO-1-trunc . . . . .	102
B.2.2 Sequenz pASK-IBA6-hHO-1-trunc . . . . .	102
<b>Danksagung</b>	<b>105</b>
<b>Publikationen</b>	<b>106</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>108</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Häm-katabolismus . . . . .	5
1.2	Absorbanzspektren zur BR Quantifizierung . . . . .	13
1.3	Circadiane Uhr und Häm-Metabolismus; Hypothetisches Modell . . . . .	18
3.1	Vergleich verschiedener cDNA Synthesen . . . . .	40
3.2	Reinheit isolierter primärer Hepatozyten . . . . .	41
3.3	Schema der Apparatur zur Begasung von Zellkulturen. . . . .	43
3.4	CO Begasung nach einer Stunde im Equilibrium . . . . .	45
3.5	Aktivität rekombinanter BLVR und Fluoreszenz mit BSA . . . . .	47
3.6	Aktivität rekombinanter hHO-1-trunc mittels Fluoreszenz . . . . .	49
3.7	Substratabhängige Aktivität von hHO-1-trunc . . . . .	51
3.8	HO-1 Aktivität in stimulierten RAW 264.7 . . . . .	52
3.9	Sensitivität der HO-Aktivitätsmessung . . . . .	53
3.10	cDNA Microarray Analyse . . . . .	56
3.11	Einfluss von CO auf die Genexpression in primären Hepatozyten . . . . .	59
3.12	Induktion von HO-1 in primären Hepatozyten . . . . .	61
3.13	Circadiane Rhythmik von HO-1 . . . . .	62
3.14	Eine funktionale E-Box im Promotor von <i>mHo-1</i> . . . . .	64
3.15	Circadiane Genexpression von Uhrgenen im <i>mHo-1</i> Knockout . . . . .	67
4.1	HO-1 als Komponente des circadianen Oszillators . . . . .	80
B.1	Expressionsplasmid pASK-IBA6-rBVR . . . . .	99
B.2	Expressionsplasmid pASK-IBA6-hHO-1-trunc . . . . .	102

# Tabellenverzeichnis

3.1	HO-Aktivitäten in Organen und Zellen . . . . .	54
A.1	Puffer und Lösungen . . . . .	97
A.2	SYBR-Green-Primer für Real-Time RT-PCR . . . . .	98



# Kapitel 1

## Einleitung

Kohlenstoffmonoxid<sup>1</sup> (CO) ist eine chemische Verbindung aus Kohlenstoff und Sauerstoff und existiert als farb-, geschmack- und geruchloses Gas. Neben der vorwiegenden Entstehung von CO in der Natur durch unvollständige Oxidation kohlenstoffhaltiger Verbindungen, ist es ebenfalls ein Produkt des Stoffwechsels von Säugetieren und anderer Organismen. Den größten Anteil dieser endogenen CO-Produktion (> 87 %) nimmt dabei der erste Schritt des Abbaus von Häm ein, der von der Enzymgruppe der Hämoxxygenasen (HO) katalysiert wird. Bei dieser enzymatischen Reaktion wird Häm zu Biliverdin IX $\alpha$ , zweiwertigem Eisen und CO oxidiert. Biliverdin IX $\alpha$  wird unmittelbar durch eine NAD(P)H abhängige Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin kovertiert.

In den letzten 15 Jahren hat dieses System der enzymatischen Häm-Degradation, das Häm-Hämoxxygenasesystem, eine Bedeutung erlangt, die über die primäre katalytische Funktion des Abbaus von Häm hinausgeht. Ausschlaggebend für dieses Erkenntnis war nicht zuletzt, dass HO-1, eine Isoform der HO, durch diverse Stimuli, wie UV-Strahlung oder oxidativer Stress, auf transkriptionaler, sowie translationaler Ebene induzierbar ist. In den Bereichen der Transplantationsimmunologie, Kardiovaskulären Forschung und Neurologie konnten biologische Funktionen, wie Zytoprotektion gegen

---

<sup>1</sup>Kohlenstoffmonoxid, auch Kohlenstoffmonooxid, gebräuchlicher Kurzname: Kohlenmonoxid.

oxidativen Stress, Vasodilatation und ein hemmendes Potential gegen Inflammation, Apoptose und Proliferation mit HO, insbesondere der Induktion von HO-1, in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden. Verantwortlich für diese Effekte werden die Metabolite des Hämabbaus gemacht, die bis vor einigen Jahren als metabolischer Abfall betrachtet wurden, da sie – insbesondere das CO – in entsprechend hohen Konzentrationen Zellgifte darstellen. CO bindet mit einer sehr hohen Affinität an Häm, worin die Toxizität von CO begründet ist, da es an den Hämgruppen im Hämoglobin der Erythrozyten den Sauerstoff verdrängt, und zu Erstickung führen kann [Ernst und Zibrak, 1998]. Weiterhin kann es auf zellulärer Ebene in den Mitochondrien die Energiebereitstellung innerhalb der Zelle blockieren [Brown und Piantadosi, 1990]. Heute nimmt CO allerdings einen neuartigen Stellenwert als gasförmiges Signalmolekül für regulative intrazelluläre Mechanismen ein. Die Eigenschaft von CO an die Hämgruppen von Hämproteinen zu koordinieren hat offenbar bei geringen, nicht toxischen Konzentrationen von CO regulatorische Funktionen. Proteine, die nach Bindung von CO durch Konformationsänderungen in ihrer regulatorischen Funktion moduliert werden und infolgedessen untergeordnete Signalwege in der Zelle beeinflussen, werden als CO-Sensoren bezeichnet. Potentielle Kandidaten für CO-Sensoren sind Proteine mit einer prostetischen Hämgruppe, die mindestens einen weiteren physiologischen Liganden haben [Roberts et al., 2004]. In eukaryotischen Organismen wurde als physiologisch wirksamer CO-Sensor die lösliche Guanylatzyklase (sGC) identifiziert, die unter Einfluss von CO in *in vitro* Experimenten und in vaskulären glatten Muskelzellen eine geringfügig gesteigerte Aktivität der Produktion von zyklischem Guanosin 3',5'-Monophosphat (cGMP) aufweist [Ignarro et al., 1982; Furchgott und Jothianandan, 1991; Morita et al., 1997]. Physiologische Prozesse, wie Vasodilatation und neuronale Signaltransduktion, die cGMP abhängig und durch CO beeinflussbar sind, lassen sich somit weitgehend erklären. Allerdings deuten die weiteren beschriebenen antiinflammatorischen und antiapoptotischen Effekte von CO auf Mechanismen hin, die sGC unabhängig, über den MAP-Kinase-Weg wirken [Brouard et al., 2000, 2002; Sato et al., 2001; Otterbein et al., 2000; Kohmoto et al., 2007],

weshalb die Existenz weiterer eukaryotischer CO-Sensoren vermutet wird. Weitere potentielle Kandidaten stellen Proteine dar, die ein mit Häm als Cofaktor assoziiertes Per-Arnt-Single-Minded-Motiv (PAS-Domäne) beinhalten. Häm-PAS-Proteine sind ubiquitär in allen Lebensformen und in diversen physiologischen Prozessen regulativ beteiligt, wobei sie u. a. mit Funktionen als Häm-basierende Sensoren für zweiatomige Gase, wie O<sub>2</sub>, NO und auch CO beschrieben wurden [Gilles-Gonzalez und Gonzalez, 2004].

Die Aktivierung, bzw. Deaktivierung von intrazellulären Signalwegen führt letztendlich zur Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, und somit zu differentiellen Profilen der Genexpression. Einen Ansatz zur Aufdeckung weiterer Mechanismen der Signalwirkung von CO bietet daher eine Genexpressionsanalyse, die eine Untersuchung vieler Gene einschließt. Daten diesbezüglich sind bisher noch nicht verfügbar. Daher ist eine Genexpressionsanalyse in Bezug auf Gene, die mit Inflammation und Apoptose assoziiert sind, Gegenstand und Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Die folgenden Unterkapitel geben einen Überblick über die Grundlagen des Häm-Hämoxygenasesystems und dessen regulatorische Funktionen hinsichtlich biologischer und pathologischer Prozesse.

Die bei der Genexpressionsanalyse identifizierten Gene konnten, in Verbindung mit Publikationen, die während der Erstellung dieser Arbeit entstanden sind, in einen Zusammenhang mit der circadianen Uhr gebracht werden. Dies spezifizierte die folgenden Fragestellungen dieser Arbeit, weshalb in den letzten Kapiteln der Einleitung der molekulare Mechanismus des circadianen Oszillators beschrieben wird.

## **1.1 Das Häm-Hämoxygenasesystem**

Das Häm-Hämoxygenasesystem ist eine übergeordnete Bezeichnung der enzymatischen Degradation des ubiquitären Moleküls Häm durch die Aktivität der Enzymgruppe der Hämoxygenasen (HO; EC 1.14.99.3). Es werden drei Isoformen von HO beschrieben,

wobei allerdings nur für zwei Formen, der HO-1 und HO-2, eine enzymatische und physiologische Funktion bekannt ist [Maines et al., 1986; McCoubrey et al., 1997]. Die Katalyse von Häm ist Bestandteil mehrerer, für den Organismus notwendiger, Prozesse, da das Häm-Molekül auf der einen Seite für biochemische Funktionen essentiell ist, aber auf der anderen Seite hohe Konzentration von freiem Häm oxidative und somit auch toxische Eigenschaften hat.

### 1.1.1 Häm

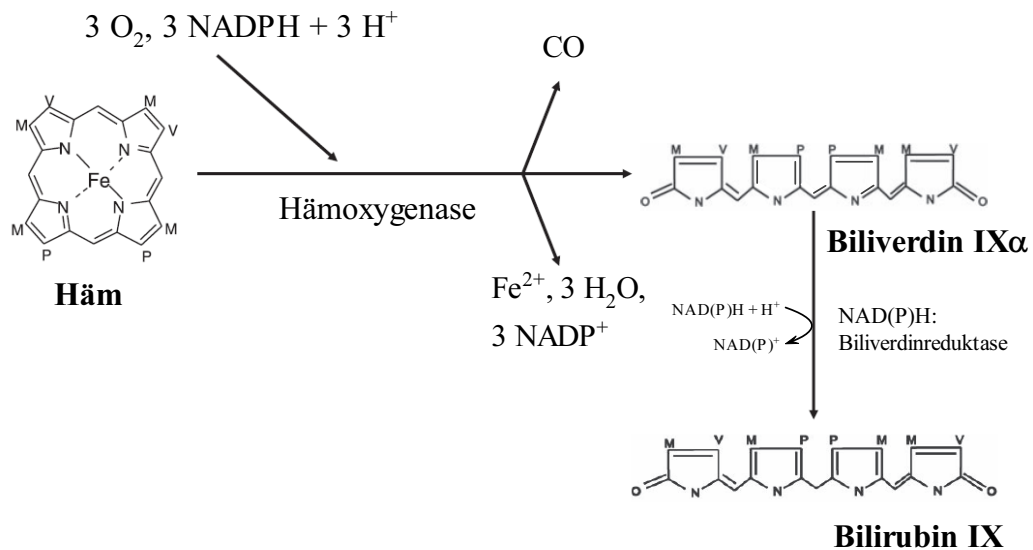
Häm ist ein Komplexmolekül, bestehend aus einem Protoporphyrin IX mit einem zweiwertigen Eisenion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) als Zentralatom<sup>2</sup>. Als Cofaktor im Hämoglobin der Erythrozyten macht es den größten Anteil des gesamten Häms im Säugetierorganismus aus und dient dort als Transportmolekül für molekularen Sauerstoff. Im Myoglobin der Muskulatur hat es eine Funktion als Sauerstoffspeicher. Weiterhin ist Häm für viele biochemische Reaktionen innerhalb funktionaler Hämproteine erforderlich. In Cytochromen ist es am Elektronentransport, der Energiegewinnung und auch an chemischen Transformationen beteiligt [Wagener et al., 2003]. Redoxreaktionen zur Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Oxidoreduktasen, wie Katalasen oder Peroxidasen, werden mithilfe von Häm katalysiert. Zu solchen Oxidoreduktasen, die ein Häm als prostetische Gruppe besitzen, zählen weiterhin wichtige Enzymsysteme, wie die Cyclooxygenase (COX) oder Stickstoffoxid-Synthase (NOS), und ebenfalls die HO, die den ersten Schritt des Abbaus von Häm katalysieren.

### Häm katabolismus

Der Katabolismus von Häm im Säugetier wurde Ende der 60er Jahre aufgeklärt [Tenhunen et al., 1968, 1969]. Der erste Schritt der Degradation von Häm wird von den HO katalysiert und ist geschwindigkeitsbestimmend. Häm wird durch die enzymatische

---

<sup>2</sup>Häm enthält ein Eisenion in der Ferro- ( $2^+$ ), Hämin hingegen in der Ferri- ( $3^+$ ) Form. Falls nicht explizit erwähnt, wird in dieser Arbeit der Term Häm generell für Eisen-Protoporphyrin IX benutzt, ohne Beschreibung des Eisen-Valenzelektronenstatus.



**Abb. 1.1: Katabolismus von Häm.**

Hämoxygenasen (HO) katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus von Häm. Häm wird zu dem Gallenfarbstoff Biliverdin IX $\alpha$  (BV) oxidiert, wobei die Reaktion 3 Mol molekularen Sauerstoff und NADPH als Elektronendonator benötigt. Die Spaltung des Porphyrinringes führt zur Freisetzung von Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und CO. Das gebildete BV wird durch eine NAD(P)H abhängige Biliverdinreduktase (BVR) weiter zu Bilirubin (BR) reduziert. Seitenketten: M, Methyl; V, Vinyl; P, Propionat. Modifiziert aus Ryter et al. [2006].

Aktivität von HO unter Spaltung des Porphyrinrings zu Biliverdin IX $\alpha$  (BV) oxidiert. Für die Reaktion werden 3 Mol  $\text{O}_2$  und 3 Mol  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  als Elektronendonator benötigt und es entstehen neben 1 Mol BV äquimolar CO und  $\text{Fe}^{2+}$  (Abb. 1.1). Der detaillierte Mechanismus dieser enzymatischen Reaktion ist bis heute noch nicht vollständig verstanden, beinhaltet aber weitere Zwischenreaktionen und -produkte auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird [Evans et al., 2008]. Im Säugetier wird das BV unmittelbar durch eine NAD(P)H abhängige Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin (BR) konvertiert [Abraham et al., 1988].

## Hämsynthese

Häm wird in allen kernhaltigen Zellen gebildet. An der Synthese von Häm sind insgesamt acht enzymatische Reaktionen beteiligt, die dekompartimentiert in den Mitochondrien und dem Cytosol stattfinden. Häm wird ausschließlich aus der Aminosäure

Glycin und Succinyl-Coenzym A synthetisiert. Der erste Schritt der Synthese ist geschwindigkeitsbestimmend und wird von dem Enzym  $\delta$ -Aminolevulinatsynthase-1 (ALAS-1) katalysiert [Shemin und Wittenberg, 1951; Shemin und Kikuchi, 1958; Shemin, 1989; Kikuchi et al., 1958]. Bei der Erythropoese (Bildung und Entwicklung der Erythrozyten) im Knochenmark bilden die Vorläufer der letztendlich kernlosen Erythrozyten die größten Mengen von Häm im Säugetierorganismus, die ca. 75–85 % des gesamt Häms ausmachen [Berk et al., 1976; Ponka, 1999]. Exklusiv in diesen Zellen ist allerdings für den ersten Schritt der Synthese von Häm das Enzym ALAS-2. Weiterhin beinhaltet der Stoffwechsel der Leber große Syntheseraten von Häm.

### **Hämpool**

Das in erythroiden Zellen im Hämoglobin enthaltene Häm unterliegt im Gegensatz zu dem in den nicht-erythroiden Zellen keiner Dynamik. Da die kernlosen Erythrozyten keinen Stoffwechsel der Synthese oder des Abbaus von Häm besitzen, bleibt das Häm hier statisch für die durchschnittliche Lebensdauer dieser Zellen von ca. 120 Tagen enthalten [Shemin, 1989]. Der Abbau dieser Zellen findet dann entweder lokal, z. B. bei Verletzungen, oder in der Milz und Leber statt. In nicht-erythroiden Zellen besteht hingegen ein dynamisches Gleichgewicht der Synthese, der Inkorporation in Apoproteine und des Abbaus von Häm. Des weiteren existiert in diesen Zellen ein Pool an „freiem“ oder „ungebundenem“ Häm, der als Vorläufer für Hämoproteine oder für regulatorische Prozesse dient [Ponka, 1999]. Die Größe des intrazellulären Hämpools ist unbekannt, allerdings verändert sich die Menge an Gesamt-Häm in NIH 3T3-Zellen im Bereich von 1–2  $\mu\text{M}$  rhythmisch mit einer Periode von ca. 8 Stunden [Rogers et al., 2008]. Eine solche rhythmische Veränderung deutet auf regulatorische Funktionen von Häm hin, die in der Literatur als sehr vielseitig beschrieben sind (Kapitel 1.1.1).

### **Regulatorische Eigenschaften von Häm**

Neben der Funktion von Häm als prosthetische Gruppe von Hämoproteinen hat dieses Molekül regulatorische Eigenschaften bezüglich der Expression von Genen auf den

Ebenen der Transkriptionskontrolle [Lathrop und Timko, 1993; Zhang und Guarente, 1995], der Stabilität von mRNA [Maniatis et al., 1976], der Proteinsynthese über eIF-2 $\alpha$ -Kinase [Chen et al., 1994], des Spleißens (Prozessierung von Prä-mRNA zu reifer mRNA) [Ponka, 1999; Zhu et al., 1999], der Prozessierung von Micro-RNA [Faller et al., 2007] und der posttranslationalen Modifikation [Raghuram et al., 2007; Yang et al., 2008; Tsiftoglou et al., 2006]. Somit unterliegen viele Proteine, wie z. B. Globine, Cytochrome und der Transferrin-Rezeptor, einer Expressionskontrolle durch Häm [Ponka, 1999]. Weiterhin hemmt Häm in nicht-erythroiden Zellen seine eigene Synthese durch die Kontrolle von ALAS-1 [Gidari und Levere, 1977; Kaasik und Lee, 2004] und induziert konzentrationsabhängig den eigenen Abbau durch eine Induktion von HO-1 [Tenhunen et al., 1970].

### **1.1.2 Hämoxygenase-1**

Die Isoformen der HO sind Produkte unterschiedlicher Gene. Die Aminosäuresequenzen von HO-1 und -2 sind nur zu 40 % homolog, wobei jedoch die katalytische Funktion beider Formen identisch ist. Zusätzlich besitzen sie jeweils einen C-terminalen hydrophoben Membrananker, mit dem sie subzellulär hauptsächlich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind [Ryter et al., 2006]. Neuerdings gibt es auch Hinweise auf die Lokalisation von HO-1 in der Plasmamembran und Calveolen [Kim et al., 2006b] und wenige Publikationen beschreiben eine durch Häm oder Glutamat stimulierte Translokation von HO-1 in den Zellkern, bzw. Kernmembran [Volti et al., 2004; Ryter et al., 2006]. Weiterhin unterscheiden sich die Expressionsmuster von HO-1 und -2 in verschiedenen Geweben. HO-2 wird im Gehirn und Hoden der Säugetiere am stärksten exprimiert, wohingegen die HO-1 in den meisten Geweben und darunter am ausgeprägtesten in der Leber und Milz exprimiert wird [Ryter et al., 2006]. HO-2 ist nicht induzierbar, wogegen die Expression von HO-1 durch äußere Stressoren, wie UV-Strahlung und Hitze (wahrscheinlich nur auf Nagetiere beschränkt [Ryter et al., 2006]), systemische oder endogene Faktoren,

wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Hypoxie, Hyperoxie, Ischämie und Stickstoffmonoxid (NO) und diverse chemische Agenzien, wie Schwermetallionen und Protoporphyrine (z. B. Cobalt-Protoporphyrin IX (CoPP) oder Häm) stark induziert werden kann [Applegate et al., 1991; Immenschuh und Ramadori, 2000]. Da HO-1 induzierbar ist und ihre katalytische Charakteristik im Vergleich zu HO-2 eine mehr als zehnfach höhere Maximalaktivität aufweist ( $V_{max} : 3,2 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{h}$  versus  $0,24 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{h}$  [Wagener et al., 2003]), scheint diese Isoform eine weitaus größere Rolle für den gezielten Hämabbau und eventuelle regulatorische Eigenschaften zu spielen.

### **Promotor und Induktion von HO-1**

Für die meisten Faktoren, die zu einer Induktion der Genexpression von HO-1 führen sind die molekularen Mechanismen bis heute noch unklar. Jedoch unterliegt eine Induktion von HO-1 weitestgehend einer Regulation auf der Ebene der Transkription, wobei der Promotor von HO-1 zahlreiche Cis-Elemente beinhaltet, die für eine Regulation der Expression von HO-1 durch Stress assoziierte Faktoren verantwortlich sind [Ryter et al., 2006]. Für die Induktoren Häm und CoPP, die in dieser Arbeit verwendet werden, wurde ein Mechanismus der HO-1 Induktion beschrieben. Der DNA bindende Repressor BACH1 und der Transkriptionsfaktor NRF2 bilden jeweils mit MAF-Proteinen Heterodimere. Sie können somit an spezifischen Sequenzen der DNA, sogenannten MAREs (MAF Erkennungssequenzen), binden. BACH1 und NRF2, jeweils als Heterodimere mit MAF-Proteinen, agieren kompetitiv an einer MARE im Promotor von *Ho-1*. Der HO-1 Induktor Häm kann an BACH1 binden und inhibiert dessen DNA Bindungsaktivität. Weiterhin induziert Häm den Export von BACH1 aus dem Zellkern und steigert dessen Ubiquitinierung, damit die proteasomale Degradation [Zenke-Kawasaki et al., 2007]. Zusätzlich fördert Häm die Stabilität von NRF2. Die dadurch verstärkte Bindung von NRF2 an die MARE führt zur Transkriptionsaktivierung des *Ho-1*-Gens [Zenke-Kawasaki et al., 2007]. Die Induktion von HO-1 durch CoPP ist ebenfalls ein posttranslationaler Mechanismus mit der



Beteiligung von BACH1 und NRF2. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von CoPP und Häm wird die Bindung von CoPP an BACH1, und ein weitgehend gleicher Mechanismus vermutet [Shan et al., 2006].

Ein weiteres regulatives Element im Promotor von *mHo-1* ist eine distale E-Box (−41 bp), die mit dem Motiv CACGTG eine DNA Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren darstellt [Ryter et al., 2006]. Die Sequenz einer E-Box ist z. B. für das als Transkriptionsfaktor agierende Heterodimer CLOCK:BMAL1 in der Regulation von circadianen Oszillatoren ein essentielles Bindemotiv [Yamamoto et al., 2004]. Für diese E-Box im *mHo-1* Promotor wurde allerdings bisher keine Funktion beschrieben.

### **HO-1 vermittelter Zellschutz**

Die Eigenschaft von HO-1 durch oxidativen Stress auf der Boten-RNA-, Protein- und Aktivitätsebene induzierbar zu sein, führte vor Jahren zu der Hypothese, dass der Hämkatabolismus neben der rein katalytischen Funktion des Hämabbaus eine natürliche, zelluläre Schutzantwort darstellt [Applegate et al., 1991]. In folgenden Arbeiten wurde gezeigt, dass HO-1 antiinflammatorische Eigenschaften besitzt [Nath et al., 1992; Willis et al., 1996]. Dies wurde ebenfalls dadurch unterstützt, da HO-1-defiziente Mäuse eine verminderte Stressantwort besitzen und in Abhängigkeit des Alters eine chronische Inflammation entwickeln [Poss und Tonegawa, 1997b,a]. Bei dem einzigen bekannten Fall einer HO-1-Defizienz im Menschen führte diese schon im Kindesalter zum Tod [Yachie et al., 1999].

Bis heute wurden die zellschützenden Eigenschaften einer induzierten HO-1 in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Modellen, wie z. B. bei Transplantation der Leber, [Kotsch et al., 2006], der Niere [Kotsch et al., 2007], des Pankreas [Becker et al., 2007], der Lunge [Otterbein et al., 1999a] von Knochenmark [Ewing et al., 2007], und weiterhin bei Lungenerkrankungen [Jin und Choi, 2005], Entzündung [Xia et al., 2006; Jin und Choi, 2005] und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems [Kinderlerer et al., 2008] beobachtet, wobei hier nur einige auszugsweise genannt sind. In Übersichtsartikeln wurde versucht, die Menge an Informationen bezüglich der

zellschützenden Eigenschaften von HO-1 zusammenzufassen [Loboda et al., 2008; Morse und Choi, 2005; Maines, 2005; Wagener et al., 2003]. Allerdings sind bis heute die molekularen Mechanismen noch immer unzureichend verstanden, und deuten darauf hin, dass der Hämstoffwechsel in einem Netzwerk von regulatorischen Signalwegen, wie u. a. p38 MAPK [Backer et al., 2008] integriert ist und die beobachteten Funktionen nicht nur auf einen konkreten Mechanismus zurückzuführen sind. Dies wird auch dadurch angezeigt, da die verschiedenen Metabolite des Hämabbaus jeweils unabhängig voneinander Zellschutz vermitteln können [Otterbein et al., 2003]. Neben den antioxidativen Eigenschaften von BV und BR, und den ebenfalls Zellschutz herbeiführenden Effekten von Ferritin, welches durch  $(\text{Fe}^{2+})$  induziert wird, gilt mittlerweile das Produkt CO als der bedeutendste Faktor der HO-1 vermittelten Zytoprotektion bezüglich einer verlangsamten Zellteilung und des Schutzes von Zellen gegen Inflammation und Apoptose [Ryter und Choi, 2007; Otterbein et al., 2003]. In der Leber hat die Fraktion der parenchymalen Zellen, die Hepatozyten, für den HO-1 oder CO vermittelten Zellschutz eine entscheidende Bedeutung. In einem murinen Lebermodell wurde gezeigt, dass die Induktion oder Überexpression von HO-1, sowie CO die Schädigungen der Leber nach einer LPS induzierten Hepatitis vermindern. Dies gilt ebenso für eine  $\text{TNF}\alpha$  induzierte Apoptose *in vivo*, wie auch in primären Hepatozyten *in vitro* [Sass et al., 2003; Kim et al., 2006a]. Die Depletion der Kupffer-Zellen, den ortständigen Makrophagen in der Leber, die neben den Hepatozyten eine große Fraktion darstellen, hatte hier auf die Ergebnisse keinen Einfluss [Sass et al., 2003]. Deshalb stellen primäre Hepatozyten die Basis für ein Zellkulturmodell der Leber, bezüglich einer Untersuchung der regulatorischen Eigenschaften von HO-1 und CO dar.

### 1.1.3 CO als Signalmolekül

CO ist ein zweiatomiges Gas, welches primär für seine toxischen Eigenschaften bekannt ist. Von Coburn und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass CO im

Säugetier ein endogenes Produkt ist [Coburn et al., 1963]. Es dauerte allerdings fast dreißig Jahre, bis erkannt wurde, dass CO im Organismus der Mammalia eine funktionale physiologische Rolle spielt. Seitdem wurde in einer Vielzahl von Arbeiten nachgewiesen, dass CO in geringen Konzentrationen einen Einfluss auf unterschiedliche biologische Funktionen hat, wie z. B. als Neurotransmitter [Snyder et al., 1998], bei der Zytoprotektion gegen Apoptose in Endothelzellen [Brouard et al., 2000], Anti-Inflammation [Otterbein et al., 2000], Schutz gegen oxidativen Stress [Otterbein et al., 1999b], Hemmung der Zellproliferation [Morita et al., 1997] und bei der Toleranz gegenüber Organtransplantationen [Song et al., 2003; Sato et al., 2001].

Da CO eine hohe relative Affinität zum Eisenatom der Hämgruppe besitzt (ca. 228-fach höher als O<sub>2</sub> [Allen und Root, 1957; Rodkey et al., 1974]), wird für einen molekularen Mechanismus der potentiellen Aktivität von CO eine Koordination von CO an das Häm von Hämoproteinen angenommen, die als Gas-abhängige Hämsensoren, bzw. CO-Sensoren bezeichnet werden [Roberts et al., 2004]. Es konnte für die cGMP produzierende sGC gezeigt werden, dass sie einen CO abhängigen Hämsensor darstellt. CO steigert dabei durch die Bindung an das Häm der sGC die Aktivität der cGMP Produktion [Ignarro et al., 1982; Furchgott und Jothianandan, 1991; Morita et al., 1997]. Als Folge einer Aktivierung der sGC durch CO, wurde die Relaxierung von glatten Muskelzellen und eine Hemmung der Thromozytenaggregation beobachtet [Brüne und Ullrich, 1987; Ramos et al., 1989; Utz und Ullrich, 1991]. Es sind aber nicht alle Effekte von CO cGMP-abhängig, wie z. B. der Einfluss auf den p38 MAPK Signalweg [Otterbein et al., 2000; Morse et al., 2003], wobei hier noch völlig ungeklärt ist, an welcher Stelle das CO diesbezüglich angreift. Allerdings wird hier ebenfalls davon ausgegangen, dass CO durch die Bindung an Häm die regulativen Eigenschaften von bisher unbekannten Hämsensoren verändern kann, und dadurch entweder direkt oder indirekt der Phosphorylierungsstatus von Elementen des MAPK Signalwegs beeinflusst wird [Morse und Choi, 2005].

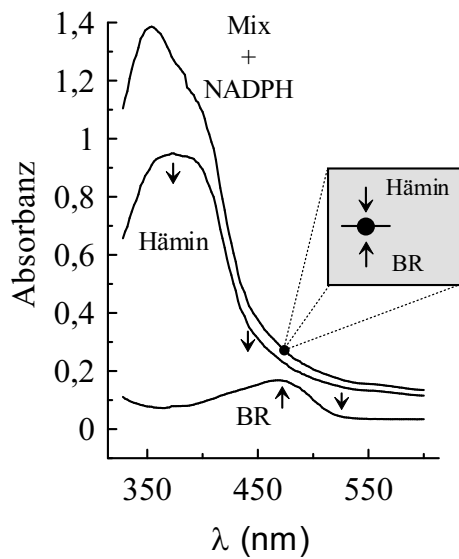
### 1.1.4 Messung der Aktivität von HO

Zur Ermittlung der intrazellulären CO-Produktion ist es erforderlich die Aktivität der HO – insbesondere der induzierbaren HO-1 – messen zu können. Seit 1968 wurden verschiedene Methoden zur Messung der Aktivität von HO in Lysaten von Zellen oder Organen beschrieben. Diese Methoden basieren auf einer *in vitro* Reaktion von 15–60 Minuten Dauer, wobei unter optimalen enzymatischen Bedingungen die Umwandlung von Häm (bzw. Hämin, die  $\text{Fe}^{3+}$  Form von Häm) über Biliverdin zu Bilirubin, unter Zugabe der zu untersuchenden Zell- oder Organlysate, stattfindet [Maines, 1992]. Für die enzymatische Umwandlung von Biliverdin zu Bilirubin wird ein, aus Ratten extrahiertes, Leberzytosolextrakt verwendet, welches eine Biliverdinreduktaseaktivität aufweist, aber aufwändig hergestellt werden muss [Maines, 1992]. Als Maß für die Aktivität von HO in den einzelnen Lysaten werden am Ende der Reaktion je nach Methode die gebildeten Metabolite CO, Biliverdin, oder Bilirubin mittels verschiedener Analyseverfahren quantifiziert. Sehr komplexe Methoden stellen dabei die radiochemische Dünnschicht-Chromatographie mit  $^{14}\text{C}$ -Häm als Substrat [Sierra und Nutter, 1992; Laitinen und Juvonen, 1995; Tenhunen, 1972], Gaschromatographie [Cavallin-Stahl et al., 1978; Vreman und Stevenson, 1988] und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) [Kutty und Maines, 1982; Noguchi et al., 1982; Onishi et al., 1980; Ryter et al., 1998; Spivak und Carey, 1985] dar. Diese hoch sensitiven Verfahren sind allerdings sehr zeitintensiv und ermöglichen nur einen geringen Probendurchsatz.

Die prinzipiell einfachste und am meisten verwendete Methodik ist die Quantifizierung von gebildetem Bilirubin mittels Spektralphotometrie bei 468 nm [Tenhunen et al., 1969, 1968; Maines und Kappas, 1975; Maines und Sinclair, 1977; Schacter, 1978]. Eine Echtzeit-Messung während der enzymatischen Reaktion ist hier allerdings ebenfalls nicht möglich, da sich die optischen Spektren der Reaktanten und Produkte (NADPH, Hämin, BR) überlagern. Die Absorbanz<sup>3</sup> eines Gemisches von verschiedenen Stoffen

---

<sup>3</sup>Absorbanz: veraltet = Extinktion; dekadisches Absorptionsvermögen (IUPAC); engl. absorbance



**Abb. 1.2: Absorbanzspektren zur Quantifizierung von BR.**

Zur spektralphotometrischen Quantifizierung von BR bei der enzymatischen Degradation von Hämin wird üblicherweise die Zunahme der Absorption bei 468 nm gemessen. Das Schema zeigt, dass Hämin das Absorbanzspektrum von BR überlagert. Während der enzymatischen Reaktion nimmt die jeweilige Konzentration von Hämin ab und die von BR zu (Pfeile). Die Echtzeit-Messung der BR Zunahme in einem vollständigen Reaktionsansatz (Mix + NADPH) ist aus diesem Grund nicht möglich.

verhält sich zu den einzelnen Wellenlängen zwar additiv, da hier aber nicht nur eine Zunahme von gebildetem BR, sondern auch eine Abnahme von Hämin, welches als Substrat in der Reaktion dient, stattfindet, ist die gemessene Veränderung der Absorbanz bei 468 nm sehr gering (Abb. 1.2). In einigen Publikationen ist daher eine Extraktion von BR in Chloroform nach einer bestimmten Reaktionszeit beschrieben, da BR, im Gegensatz zu Hämin, sehr gute Löslichkeitseigenschaften in Chloroform aufweist [Schacter, 1978; Tenhunen et al., 1968]. Dadurch ist diese Methode allerdings ebenfalls sehr aufwändig und erhöht den systematischen Fehler.

Alle beschriebenen Verfahren für die Messung der HO-Aktivität sind für den Einsatz eines unaufgereinigten Zelllysates, oder -extraktes ungeeignet, da die gebildete Menge an BR nicht, oder nur sehr geringfügig zu detektieren ist. Zur Erhöhung der Messsignale wird daher eine vorherige Anreicherung von Mikrosomen in den Lysaten durchgeführt (Ultrazentrifugation). In diesen Membranvesikeln ist HO-1, gebunden durch einen c-terminalen Membrananker, hauptsächlich vertreten.

Zusammengefasst haben alle bisher publizierten Methoden zur HO-Aktivitätsmessung nachteilig gemeinsam, dass sie sich (i) bei der Messung nur auf den Endpunkt der Reaktion beziehen, somit keine enzymatische Kinetik darstellen, (ii) teilweise sehr aufwändige Prozeduren beinhalten und (iii) sich nur für einen geringen Probendurchsatz

eignen.

Hieraus resultiert ein Bedarf an der Weiterentwicklung einer Methode, die Aktivität von HO in einer enzymatischen Kinetik zu messen, die ohne aufwändige Probenaufbereitung, wie z.B. die Aufreinigung von Mikrosomen, eine akzeptable Sensitivität in einem parallelen Ansatz von mehreren Proben gewährleistet.

### **Fluoreszenz von Bilirubin**

Da BR fluoreszierende Eigenschaften besitzt, könnte dies einen methodischen Ansatz zur Messung der HO Aktivität bieten. Die Messung der Fluoreszenz von gebildetem Bilirubin würde dabei nicht auf eine Endpunktmessung beschränkt sein und könnte eventuell auch in vitalen Zellen, die Bilirubin sezernieren, angewandt werden. Bei Beaven et al. [1974] sind erstmals die Fluoreszenzeigenschaften von Bilirubin beschrieben worden. Fluoreszenz ist die spontane Emission von elektromagnetischer Strahlung (Licht) beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Ein Stoff mit fluoreszierenden Eigenschaften emittiert daher Licht, nachdem er zuvor mit Licht einer höheren Energie angeregt wurde. Diese Emission von Licht findet bei der Fluoreszenz in einem sehr kleinen Zeitintervall von ca.  $< 10^{-6}$  Sekunden statt. Bilirubin kann durch Licht mit Wellenlängen um 463 nm angeregt werden und emittiert im Bereich von 500–600 nm mit einem Maximum bei 528 nm. Die Fluoreszenz von freiem Bilirubin in wässriger Lösung ist sehr gering, wobei die Bindung an Albumin eine drastische Steigerung der Fluoreszenz bewirkt. Fluoreszenz und Konzentration von Bilirubin verhalten sich proportional zueinander, wenn das Verhältnis von Bilirubin zu Albumin kleiner 1 ist [Athar et al., 1999]. Diese Voraussetzungen stellen gute Bedingungen für eine Kinetik-Messung von gebildetem Bilirubin, bzw. HO-Aktivität, während der enzymatischen Reaktion dar.

## 1.2 Zusammenhang des Hämstoffwechsels mit der circadianen Uhr

Eigene Ergebnisse und während der Erstellung dieser Arbeit publizierte Arbeiten weisen Zusammenhänge zwischen dem Häm-Hämoxygenasesystem zu intrazellulären regulatorischen Mechanismen der circadianen Uhr auf. Da diese Erkenntnisse die weitere wissenschaftliche Vorgehensweise in dieser Arbeit geprägt haben, werden zum Verständnis an dieser Stelle die molekularen Grundlagen der circadianen Uhr eingeführt. Die folgenden Absätze beschreiben ein aktuelles, grundlegendes Modell der Funktionsweise von circadianen Oszillatoren im Säugetier und weiterhin ein hypothetisches Modell der Vernetzung der circadianen Uhr mit dem Häm-Hämoxygenasesystem.

### 1.2.1 Die circadiane Uhr der Mammalia

Die biologische Funktion der inneren Uhr ist eine endogene zeitliche Anpassung von Organismen an periodisch wechselnde Verhältnisse der Lebensumgebung. Täglich sich rhythmisch verändernde äußere Bedingungen, wie der Wechsel von Tag und Nacht, können dadurch antizipiert werden, resultierend in der Funktionsoptimierung dieser Organismen im Wechselspiel mit ihrer Umwelt. Circadiane<sup>4</sup> Uhren sind endogene Oszillatoren, die tägliche Rhythmen in Physiologie und Verhalten steuern. Der fundamentale Mechanismus der endogenen Rhythmus-Generierung ist zellautonom, und führt intrazellulär durch ein genregulatorisches Netzwerk mit verzögerten Rückkopplungsschleifen zu Oszillationen auf molekularer Ebene [Balsalobre et al., 1998; Okamura, 2007; Schibler und Sassone-Corsi, 2002; Yagita et al., 2001].

Der hauptsächliche Schrittmacher der inneren Uhr befindet sich im Suprachiasmatischen Nukleus (SCN), einer Region im Gehirn, die nur aus wenigen tausend Neuronen besteht. Der Rhythmus des SCN-Oszillators wird durch den hauptsächlichen

---

<sup>4</sup>von lateinisch *circa*, ungefähr; *dies*, Tag.

Zeitgeber Licht mit den zyklischen Lichtbedingungen der Umwelt gekoppelt. Der SCN sendet diese Zeitinformation über hormonelle und elektrische Signale an alle molekularen Oszillatoren in den peripheren Geweben, um diese zu synchronisieren und in tageszeitspezifische, physiologische Prozesse des jeweiligen Gewebes zu übersetzen, wie beispielsweise Schlaf-Wach-Rhythmus, Körpertemperatur und metabolische Organfunktionen [Okamura, 2007; Schibler und Sassone-Corsi, 2002; Yagita et al., 2001; Reppert und Weaver, 2002].

### **Genregulatorische Rückkopplungsschleifen bilden molekulare Uhren**

Intrazellulär erzeugt ein genregulatorisches Netzwerk mit mehreren verzahnten negativen und positiven Rückkopplungsschleifen circadiane Oszillationen auf molekularer Ebene. Zentrale Bestandteile des circadianen Oszillators sind die positiven Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1, die zur Familie der **b**asischen **H**elix-**L**oop-**H**elix (bHLH)-PAS (**P**eriod-**A**rnt-**S**ingle-Minded)-Transkriptionsfaktoren gehören [Gekakis et al., 1998]. CLOCK und BMAL1 heterodimerisieren über ihre PAS-Domänen, binden an cis-regulatorische Enhancer-Sequenzen – die sogenannten E-Box-Elemente mit dem Bindungsmotiv CACGTG – in der Promotorregion ihrer Zielgene und aktivieren deren Transkription. CLOCK und BMAL1 stellen damit die positiven Elemente innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife dar, indem diese als Transkriptionsfaktor-Komplex CLOCK:BMAL1 die Expression der drei paralogen Gene Period- (Per1–3) und der zwei Cryptochrom- (Cry1–2) Gene aktiviert. Im Cytosol bilden die PER- und CRY-Proteine Komplexe und translozieren nach einer zeitlichen Verzögerung in den Zellkern, um dort als Repressoren ihrer eigenen Transkription die Aktivität von CLOCK:BMAL1 zu inhibieren (negative Rückkopplung) [Reppert und Weaver, 2002]. Ganz entscheidend für die Periode dieser molekularen Oszillation ist das Ausmaß der zeitlichen Verzögerung innerhalb dieser negativen Rückkopplung [Schibler und Sassone-Corsi, 2002]. Multiple posttranslationale Prozesse, wie z. B. Komplexbildung, Phosphorylierung, Degradation und subzelluläre Lokalisation dieser Proteine bestimmen den Grad der Verzögerung und haben damit einen entscheidenden Einfluss



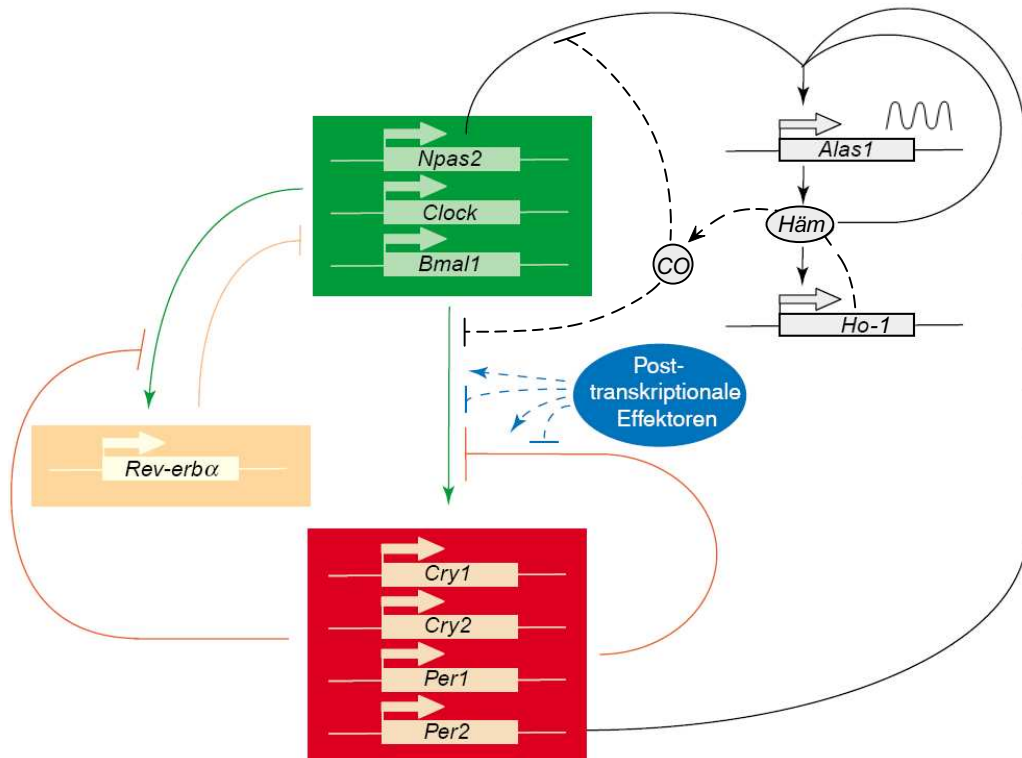
auf die Periode und Phase des circadianen Oszillators. Ein weiteres positives Element ist NPAS2, welches paralog zu CLOCK ist, und demnach ebenfalls mit BMAL1 ein Heterodimer bilden kann. Im SCN haben CLOCK und NPAS2 eine gleichwertige, oder auch gegenseitig kompensierende Funktion in der Rhythmusgenerierung [DeBruyne et al., 2007]. NPAS2 wird ebenfalls in peripheren Organen circadian exprimiert. Es steht allerdings noch nicht endgültig fest, in welchem Umfang NPAS2 auch dort diese Funktion besitzt [Yamamoto et al., 2004].

Zusätzliche Komplexität erhält das System durch die Verknüpfung mit einer weiteren Rückkopplungsschleife, die über die Transkription des *Bmal1*-Gens reguliert wird. Ein Element dieser Rückkopplung ist REV-ERB $\alpha$ , dessen Transkription ebenfalls durch NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 reguliert wird. REV-ERB $\alpha$  reguliert über eine Transkriptionskontrolle von BMAL1 den positiven Arm der negativen Rückkopplungsschleife und hat somit einen entscheidenden Einfluss auf den Oszillator. Ein weiterer Regulationsmechanismus für die Transkription circadian exprimierter Gene sind D-Boxen. D-Boxen sind DNA-Bindungselemente für Transkriptionsfaktoren. Der wichtigste Vertreter für das circadiane System ist DBP (Albumin **D**-Element **B**inding **P**rotein). Die Transkription von DBP selbst ist über E-Boxen circadian reguliert. Die Bindung von DBP an D-Boxen, die in Promotoren einiger Gene des Kernoszillators und in vielen circadian regulierten Genen gefunden wurden, führt zu einer Aktivierung der Transkription. Obwohl auch Gene des Kernoszillators D-Boxen enthalten, ist noch nicht endgültig geklärt, inwiefern die Transkription von D-Boxen für die Rhythmusgenerierung notwendig ist. Die Bedeutung von D-Boxen und DBP liegt anscheinend eher im Output des circadianen Oszillators, der Regulation der Transkription von Uhr-kontrollierten Genen [Yamaguchi et al., 2000].

### **Interaktion der circadianen Uhr mit dem Häm-Hämoxygenasesystem**

Interessanterweise ist der Häm-Metabolismus mit dem Mechanismus des circadianen Oszillators gekoppelt. Es wurde von Kaasik und Lee [2004] gezeigt, dass die Expression von ALAS1, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Häm-Synthese, durch die

circadiane Uhr koordiniert wird. Bei Schibler und Naef [2005] wurde der Metabolismus von Häm in einem Modell mit dem molekularen Oszillator der circadianen Uhr



**Abb. 1.3: Hypothetischer Zusammenhang des circadianen Oszillators mit dem Häm-Metabolismus im Säugetier.**

Der molekulare Oszillator besteht aus einer negativen Rückkopplungsschleife, die sich aus einem positiven Arm (grün) und einem negativen Arm (rot) zusammen setzt. In der Leber (auch in anderen Geweben) agieren die Aktivatoren CLOCK, NPAS2 und BMAL1 im positiven Arm, indem CLOCK und NPAS2 jeweils als Heterodimer mit BMAL1 an E-Boxen entsprechender Zielgene binden und deren Transkription initiieren. Die vier Glieder des negativen Arms, CRY1, CRY2, PER1 und PER2 formen Heterodimere, die das Aktivierungspotential des positiven Arms verringern. REV-ERB $\alpha$  ist nicht für die Generierung einer circadianen Rhythmik erforderlich, koppelt hingegen die beiden Arme der negativen Rückkopplungsschleife durch einen Einfluss auf die Periodenlänge und Phase. Die Dynamik der rhythmusgenerierenden Rückkopplungsschleifen wird weiter durch post-transkriptionale Effektoren (blau), wie Proteinkinasen und -phosphatasen moduliert [Reppert und Weaver, 2002]. Ein Zusammenhang des Häm-Metabolismus mit der circadianen Uhr wurde durch den Nachweis einer NPAS2-BMAL1 abhängigen rhythmischen Expression von ALAS1 hergestellt [Kaasik und Lee, 2004]. NPAS2 assoziiertes Häm mit gebundenem Kohlenmonoxid (CO) verhindert die Bindung von NPAS2-BMAL1 Heterodimeren an DNA in einem zellfreien *in vitro* Ansatz [Dioum et al., 2002]. *In vivo* konnte ein solcher hypothetischer Zusammenhang des Häm-Katabolismus über eine Rückkopplung durch gebildetes CO mit dem molekularen Uhrwerk (unterbrochene Linie) bisher nicht gezeigt werden. *Modifizierte Abbildung aus Schibler und Naef [2005].*

kombiniert (Abb. 1.3). In diesem Modell wird weiterhin postuliert, dass CO, welches von HO-1 gebildet wird, eine Rückkopplung auf den Oszillator vermitteln könnte, da ein hemmender Effekt von CO auf die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktor-Komplexes NPAS2:BMAL1 in einem zellfreien *in vitro* Ansatz gezeigt werden konnte [Dioum et al., 2002]. Allerdings wurde ein solcher Einfluss von CO nie *in vivo* nachgewiesen. Weitere, kürzlich veröffentlichte, Zusammenhänge des Häm-Metabolismus mit der circadianen Uhr zeigen, dass Häm an REV-ERB $\alpha$  bindet und dessen Aktivität modulieren kann [Raghuram et al., 2007]. Außerdem hat das essentielle Element der circadianen Uhr PER2 ebenfalls eine Häm-Bindedomäne, wobei die Bindung von Häm einen Einfluss auf die proteasomale Degradation von PER2 hat [Yang et al., 2008].

## 1.3 Zielstellung

Nach heutiger Auffassung stellt das von den HO gebildete CO ein Signalmolekül dar, welches intrazellulär für die Modulation von noch weitgehend unbekannten CO-Sensoren verantwortlich ist. Die Induktion der HO-1 Aktivität und die damit verbundene endogene CO Produktion, sowie exogenes CO haben einen Einfluss auf molekulare regulatorische Prozesse, die mit biologischen Funktionen des Schutzes von Zellen gegen oxidativen Stress, Inflammation und Apoptose im Zusammenhang stehen [Kim et al., 2006b].

Das Ausmaß genregulatorischer Eigenschaften der Aktivität von HO-1 und somit auch gebildetem CO bezüglich eines differentiellen Expressionsprofils von Genen, die mit den oben genannten Funktionen assoziiert sind, ist allerdings bis heute noch nicht bekannt. Die Leber hat diverse regulatorische Stoffwechselfunktionen, ist eines der Hauptorgane des Hämstoffwechsels und HO-1 ist in diesem Organ induzierbar. In der Leber und auch in Hepatozytenkulturen wurden schützende Funktionen von CO und einer induzierten HO-1 beschrieben.

In dieser Arbeit sollte daher

1. der Einfluss von CO Inhalation, endogen freigesetztem CO und chemisch induzierter HO-1 auf die Genexpression von ausgewählten Genen, die mit Inflammation und Apoptose assoziiert sind, mittels cDNA-Chip Technologie in einem murinen *in vivo*-Lebermodell untersucht, und
2. die differentiell exprimierten Gene in einen funktionalen, bzw. physiologischen Zusammenhang gebracht werden.
3. Die gefundenen Zusammenhänge sollten in Hypothesen formuliert werden, die weiterführend in Zellkulturversuchen überprüft werden sollten. Vorrangig sollten diese Experimente mit primären Hepatozyten als *in vitro*-Lebermodell durchgeführt werden.
4. Für die Untersuchungen im Zellkulturmodell sollten Methoden etabliert, bzw.

optimiert werden, die eine Durchführung ermöglichen oder erleichtern:

- (a) Es sollte für eine Methode der Isolation von murinen primären Hepatozyten eine Vereinfachung und Optimierung durchgeführt werden.
- (b) Zur Behandlung von Zellen mit CO sollte eine Begasungsanlage etabliert werden.
- (c) Es sollte eine, auf den Fluoreszenz-Eigenschaften von BR basierende, sensitive Methode zur Messung der HO-Aktivität in Lysaten von Zellen und Organen etabliert werden.
- (d) Da die Real-Time RT-PCR in dieser Arbeit eine grundlegende Methode darstellt und die Synthese von cDNA ein kritischer Punkt dieser Methode ist, sollte in einem Vergleich das Protokoll mit der höchsten Sensitivität und Reproduzierbarkeit für die cDNA-Synthese gefunden werden.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Mausstämme

Für Organentnahmen und die Isolation von Hepatozyten wurden 6–8 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse verwendet. Die Tiere wurden vom Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Berlin, Deutschland) erhalten. Zur Isolation primärer Fibroblasten wurden *Ho-1<sup>-/-</sup>*- und *Ho-1<sup>+/+</sup>*-Mäuse (6 Wochen alt) mit dem genetischen Hintergrund 129/Svj  $\times$  BALB/c, die ursprünglich von Yet et al. [1999] generiert wurden, verwendet. Die Aufzucht der Tiere fand in der tierexperimentellen Einrichtung der II. Medizinischen Klinik – Kardiologie, Angiologie und Intensivmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz statt. Die jeweils homozygoten Tiere stammten aus einem Wurf.

### 2.2 Isolation primärer Zellen

#### 2.2.1 Isolation muriner Hepatozyten

Hepatozyten wurden aus der Maus nach der Methode von [Seglen, 1976] in modifizierter Form isoliert. Dazu wurde die Maus durch zervikale Dislokation (Genicküberstreckung) getötet und unmittelbar danach der Bauchraum geöffnet. Die Pfortader und die

untere Hohlvene wurden freigelegt und die Leber durch die Pfortader mittels einer G27-Kanüle für zwei Minuten mit ca. 15 ml Puffer A (s. Anhang, Tab. A.1, S. 97) perfundiert. Die Kanüle wurde mit einer Micro-Gefäßklemme fixiert und die untere Hohlvene zur Druckentlastung durchtrennt. Für weitere zwei Minuten wurde die Leber mit 20 ml Puffer B (s. Anhang, Tab. A.1, S. 97), versetzt mit ca. 1 U Collagenase Typ IV (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), perfundiert. Für diese Perfusion mit zwei Medien wurde ein Schlauchsystem etabliert, wobei durch eine Gabelung ein zwei Äste die unterschiedlichen Puffer nacheinander, ohne Luftblasen, durch 20 ml Spritzen eingeleitet werden konnten. Nach Entfernung der Gallenblase wurde die Leber aus dem Tier herausgenommen, in 10 ml Puffer B mit einem stumpfen Spatel ausgestrichen und unter Vermeidung von großen Scherkräften mittels einer Pasteurpipette weiter vereinzelt. Die Zellsuspension wurde durch einen Zellfilter (100  $\mu$ m Porengröße, BD-Biosciences, NJ, USA) filtriert, mit Puffer B auf ein Volumen von 50 ml gebracht und die Hepatozyten dreimal bei 40 g für 5 Minuten sedimentiert, wobei der jeweilige Überstand verworfen wurde. Die so aufgereinigte Fraktion der Hepatozyten wurden mit einer Dichte von  $1-2 \cdot 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in Williams E Medium (Sigma-Aldrich), versetzt mit 10 % FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland) und Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100  $\mu$ g/ml), auf Gelatine (0,2 %) beschichteten Zellkulturschalen ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach zwei Stunden wurde das Medium gewechselt, um tote und nicht adhärierte Zellen zu entfernen. Die Reinheit der Hepatozyten wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS Scan, BD) einer intrazellulären Färbung mit einem FITC konjugierten monoklonalen Maus IgG1 Antikörper gegen Cytokeratin-18 (CK-18-FITC, Santa Cruz Biotechnology) bestimmt. Cytokeratin-18 ist in Hepatozyten besonders stark exprimiert und gilt deshalb als spezifischer Marker für diese Zellen [Sharma et al., 2005]. Hepatozyten wurden 30 Minuten in PBS mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und in PBS mit 0,2 % Saponin permeabilisiert. Die Zellen wurden in PBS mit 0,2 % Saponin mit anti-CK-18-FITC (5  $\mu$ g/ml) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend mit PBS/0,2 % gewaschen. Als Kontrolle für die FACS-Einstellungen wurden die Zellen

gleichermaßen mit einem Ratten IgG1 Antikörper behandelt.

### 2.2.2 Isolation muriner Fibroblasten

Ohrengewebe von *Ho-1<sup>-/-</sup>*- und *Ho-1<sup>+/+</sup>*-Mäusen wurde jeweils in DMEM (Biochrom), versetzt mit Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Amphotericin B (2,5 µg/ml), mit einem Skalpell fein zerkleinert. Zur enzymatischen Auflösung der Gewebestruktur und Vereinzelung der Hautfibroblasten wurde dem Medium eine Collagenase-haltige Enzymmischung (Bledzyme 3, Roche, Mannheim, Deutschland) in einer Endkonzentration von 0,2 U/ml zugesetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette weiter vereinzelt, zweimal mit PBS (s. Anhang, Tab. A.1, S. 97) gewaschen (300 g, 5 min), in DMEM mit 10 % FKS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) bei 37 °C in Gewebekulturflaschen T-25 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert und über maximal drei Passagen zu ausreichenden Zellzahlen expandiert.

## 2.3 Untersuchungen der Genexpression

### 2.3.1 RNA-Isolation

Für die PIQOR<sup>TM</sup> Micro-Arrays wurden männliche C57Bl/6 Mäuse für 6 Stunden mit CoPP (5 mg/kg/ip, Frontier Scientific, Carnforth, Großbritannien), MC (0,5 g/kg, oral, Sigma-Aldrich) und CO (500 ppm, Atemluft)(je n = 3) behandelt. 12 unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Lebern wurden mittels Ultraturrax (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) geschert und in Lysispuffer lysiert. Die Isolation der RNA wurde mit dem System NucleoSpin RNA L-Kit (Clontec, Mountain View, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNAs der Kontroll-Lebern wurde vereint. Für die Real-Time-PCR wurde die RNA mit dem System Absolutely RNA Miniprep-Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach Herstellerangaben isoliert. Organe wurden ebenfalls mittels Scherkraft homogenisiert (Ultraturrax). Zellen wurden direkt durch



die Zugabe des System-internen Lysispuffers aufgeschlossen.

RNAs wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2 cDNA-Synthese für Real-Time RT-PCR

Die Synthese der cDNA erfolgte durch die Anwendung des kommerziellen Systems QuantiTect<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Die RNAs wurden photometrisch bei 260 nm vermessen und jeweils eine gesamt Menge von 1  $\mu\text{g}$  für die cDNA-Synthese eingesetzt.

Weiterhin wurden für einen Vergleich verschiedene Protokolle der cDNA-Synthese durchgeführt. Diese Protokolle unterschieden sich ausschließlich in der Art des eingesetzten Syntheseprimers. Es wurden als Synthesepriemer „Oligo desoxy-Thymidine“ (odT), bestehend aus 15 Thymidinen, „Random Hexamere“ (Random 6) und „Random Pentadecamere“ (Random 15) verwendet, die sich jeweils aus einem homogenen Gemisch aus jeweils 6, bzw. 15 zufällig angeordneten Nukleotiden zusammensetzen. Es wurden Synthesen in einem Gesamtvolumen von 40  $\mu\text{l}$  durchgeführt, in der jeweils 2  $\mu\text{g}$  RNA eingesetzt wurden. 18  $\mu\text{l}$  RNA (2  $\mu\text{g}$ ) wurden mit 2  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Syntheseprimers (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gemischt und für 10 Minuten bei  $75^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach zweiminütiger Abkühlphase auf Eis wurden 8  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (First Strand Buffer, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 4  $\mu\text{l}$  Dithiothreitol (DTT, 0,1 M, Invitrogen), 4  $\mu\text{l}$  dNTP (Invitrogen, 2,5 mM), 2  $\mu\text{l}$  DNase (2 U/ $\mu\text{l}$ , Applied Biosystems/Ambion, Foster City, USA) und 0,5  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ , Invitrogen) zugesetzt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten inkubiert. Nach einer fünf minütigen DNase-Inaktivierung bei  $75^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben abgekühlt, jeweils 1  $\mu\text{l}$  MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen) und RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ , Invitrogen) hinzugefügt, dann für eine Stunde bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Ansätze für fünf Minuten auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die cDNAs wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.3 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR wurde mit 40 zweiseitigen-PCR-Zyklen bei 60 °C und 95 °C in einem 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden je 1 µl der jeweiligen cDNA in 13 µl Ansätzen mit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) für Primerpaare, die selbst zusammengestellt wurden (s. Anhang, Tab. A.2, S. 98), oder für kommerzielle QuantiTect®SYBR-Green Primer Assays (Qiagen), eingesetzt. Kommerzielle Primer wurden für die murinen Gene mPer2, mRev-erbα, mDbp und mBmal1 verwendet. Die PCRs wurden in Doppelansätzen durchgeführt, wobei ein maximaler Unterschied von 0,5 C<sub>T</sub> erlaubt war. Die jeweiligen arithmetischen Mittel wurden durch Anwendung der vergleichenden C<sub>T</sub>-Methode zum Kalibrator, dem Referenzgen mHprt1, bzw. hHprt1, normalisiert und wahlweise zu einem Kontrollwert relativiert [Schmittgen und Livak, 2008].

### 2.3.4 cDNA Micro-Array

Zur Genexpressionanalyse für 819 immunrelevante Maus cDNAs wurden PIQOR™ cDNA Micro-Arrays im Auftrag von der Firma Miltenyi Biotec produziert. Aus 100 µg Gesamt-RNA muriner Lebern wurde die mRNA mittels eines kommerziell erhältlichen Kits Oligotex-mRNA-Mini-Kit isoliert (Qiagen). Die Synthese der cDNA, Fluoreszenzmarkierung mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5, Hybridisierung der Arrays und Detektion wurde von Miltenyi Biotec nach internen, standardisierten Protokollen durchgeführt [Bosio et al., 2002]. Für die Erstellung der Expressionsprofile wurden die Signal- und Hintergrundintensitäten von Cy3 und Cy5 mittels ImaGen-Software Version 4.1 (BioDiscovery, Los Angeles, USA) bestimmt.

## 2.4 Messung der Hämoxygenaseaktivität

### 2.4.1 Klonierung und Darstellung von rekombinanter Biliverdinreduktase und Hämoxygenase-1

Die rekombinanten Proteine der ratten BLVR und humaner HO-1 wurden in einem kommerziellen Vektor pASK-IBA6 hergestellt. Dieser Vektor beinhaltet einen *tet*-Promotor/Operator, der eine streng kontrollierte Überexpression von Proteinen ermöglicht. Diese kann vollständig durch geringe, nicht antibiotische, Konzentrationen von Anhydrotetracyclin induziert werden. Die konstitutive Expression des *tet*-Repressorgens, welches auf dem Plasmid lokalisiert ist, bewirkt die Repression des *tet*-Promotors bei Abwesenheit des Induktors. Ein N-terminal angefügtes *ompA*-Signal vermittelt die posttranslationale Sekretion des rekombinanten Proteins in den Periplasmatischen Raum, und wird dort von einer endogenen Signalpeptidase abgespalten. Des weiteren wird in diesem System das rekombinante Protein N-terminal mit einem *Strep-tag II* (NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-COOH, [Schmidt et al., 1996]) fusioniert, wodurch optional eine Aufreinigung mittels *StrepTactin* erfolgen kann [Voss und Skerra, 1997].

Es wurde RNA aus Rattenleber und humanem Blut extrahiert, zu cDNA synthetisiert und jeweils in einer PCR für die Amplifikation der cDNA von ratten BLVR, bzw. humaner HO-1 mit entsprechenden Primern eingesetzt. Die Primer für die Ratten-BLVR wurden so gewählt, dass sie die Sequenz vom Startcodon ATG bis zum Stoppcodon TGA amplifizieren und zusätzlich am 3'- und 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *BsaI* anfügten. Für die humane HO-1 wurden die Primer so gewählt, dass sie die Sequenz vom Startcodon ATG bis zur Base 795, also nach dem 265sten Codon, amplifizieren. Es wurde ebenfalls am 3'- und 5'-Ende eine *BsaI* Schnittstelle so eingefügt, dass in beiden Fällen eine Ligation mit dem *BsaI* geschnittenen pASK-IBA6 Vektor in richtiger Orientierung erfolgen konnte. Zur Überexpression der Proteine wurde jeweils eine Vorkultur (LB-Medium

mit Ampicillin; 5 ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (220 rpm). Mit 2 ml der Vorkultur wurden je 100 ml LB-Medium (mit Ampicillin) angeimpft, diese für ca. drei Stunden unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 geschüttelt und anschließend mit 20 µg Anhydrotetracyclin stimuliert. Nach weiteren drei Stunden wurden die Zellen bei 4500 g und 4 °C für 10 Minuten sedimentiert und für 30 Minuten auf Eis in je 2 ml Lysispuffer, supplementiert mit Protease Inhibitoren, lysiert. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 14000 rpm, 4 °C, wurde der Überstand zu 50 % mit Glycerin versetzt und bei –20 °C gelagert.

### 2.4.2 Messung der Aktivität rekombinanter BVR mittels Absorbanz

Lysate der bakteriell überexprimierten BVR (200 µg Gesamt-Protein) wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 100 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 0,2 mM BV (Frontier Scientific), 0,8 mM NADPH (Sigma-Aldrich), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 0,8 mM Glukose-6-Phosphat (Sigma-Aldrich), 200 nM BSA (Sigma-Aldrich), und 1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Sigma-Aldrich) versetzt und homogen gemischt. Die Absorbanz wurde bei 37 °C minütlich im Spektrum von 350–600 nm detektiert (Infinite M200; TECAN). Die Aktivität wurde mittels des dekadischen molaren Absorptionskoeffizienten von 60 l<sup>1</sup>/mM · cm berechnet.

### 2.4.3 Messung der HO-Aktivität mittels Fluoreszenz

Zellen ( $2,5 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ ) oder Organstücke wurden in 50–100 µl Tris-HCl (100 mM, pH 7,4) mit 0,1 % Triton X100, 150 mM NaCl und Protease Inhibitoren (Complete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim, Deutschland) auf Eis lysiert, zu 40 % mit Glycerin versetzt, sofort für die Reaktion eingesetzt oder bei –20 °C gelagert. 10 µl der Lysate wurde mit 90 µl eines Reaktionsreagenz gemischt. Diese Reaktionslösung setzte sich zusammen aus: 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4), 0,25 mM Hämin, 0,8 mM β-NADPH, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM Glukose-6-Phosphat, 1 U Glukose-6-

Phosphat-Dehydrogenase und 5  $\mu$ l Bakterienlysat rekombinant überexprimierter BVR (Kapitel 2.4.1). Die Zunahme der Fluoreszenz in den Rektionansätzen wurde bei 37°C in einer schwarzen 96-Loch Platte (Nunc, Langenselbold, Deutschland) in einem Microtiter-Platten-Fluoreszenzmessgerät (Infinite M200, TECAN, Deutschland) je nach Aktivität über einen Zeitraum von 20 Minuten bis mehreren Stunden gemessen. Dazu wurde mit Licht einer Wellenlänge von 463, bzw. 441 nm angeregt und die Emission im Spektrum zwischen 500 und 600 nm, oder direkt bei 528 nm diskontinuierlich im Abstand von 5 Minuten detektiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden durch Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate gegen die Zeit linearisiert. Die Quantifizierung von gebildetem Bilirubin erfolgte mittels einer Standardkurve von Bilirubin (0,2–2 ng) in gleichen Ansätzen ohne Lysat. Bezogen auf die gesamt Proteinmenge in den Lysaten, bestimmt nach Bradford [1976], wurden die Aktivitäten in  $\text{nmol}_{BR}/\text{min} \cdot \text{mg}_{Protein}$  berechnet.

#### **2.4.4 HO-1 Induktion in RAW-Zellen und Messung der HO-Aktivität mittels Absorbanz**

RAW 264.7-Zellen wurden in RPMI 1640, versetzt mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin (PAA), 100 U/ml Penicillin (PAA) und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (PAA) kultiviert. Eine Behandlung der Zellen erfolgte durch Zugabe von CoPP (Frontier Scientific) in den Konzentrationen 15, 30 und 50  $\mu$ M für 24 Stunden. Die Zellen wurden lysiert (Lysispuffer s. A.1, S. 97) und je 100  $\mu$ l (750–1000  $\mu$ g Gesamtprotein) für eine Reaktion mit 100 mM Tris-HCl, 15  $\mu$ M Hämin, 0,8 mM NADPH, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,8 mM Glukose-6-Phosphat, 6 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, und 20  $\mu$ l Lysat von bakteriell überexprimierter BVR in einem Gesamtvolumen von 600  $\mu$ l eingesetzt. Die Ansätze wurden 10 Sekunden homogen gemischt und in zwei Proben zu gleichem Volumen geteilt. Eine Reaktion wurde sofort durch Zusatz von 200  $\mu$ l Chloroform auf Eis gestoppt, und die zweite nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 Stunde. Alle Proben wurden jeweils zweimal für 30 Sekunden gemischt und zentrifugiert (14000 g 10 min,

4 °C). Anschließend wurde die differentielle Absorbanz in der unteren Chloroform-Phase bei 468 – 530 nm gemessen (Infinite M200, TECAN). Die Menge an gebildetem BR wurde unter Verwendung des dekadischen molaren Absorptionskoeffizienten von  $60 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  berechnet und für die Aktivität auf Zeit und Gesamtprotein relativiert.

## 2.5 Begasung mit Kohlenstoffmonooxid

Zur Begasung von Zellkulturen wurde ein System etabliert, in dem es möglich war die Versuchsansätze von Kontrollzellen und CO behandelten Zellen parallel, zur gleichen Zeit, unter gleichen Temperatur-, Luftdruck sowie Wasserdampfdruckbedingungen zu begasen. Bei diesem System fand die Begasung beider Versuchsansätze mit dem selben Trägergas (angesaugte, trockene Umgebungsluft [ca. 78 % N<sub>2</sub>, 20,9 % O<sub>2</sub>], angereichert mit 4.75 % CO<sub>2</sub>) statt, welches für die Kontrollzellen direkt, und für die CO begasten Zellen mit verschiedenen beigemischten CO-Mengen (200–10000 ppm), eingesetzt wurde.

Abbildung 3.3 (S. 43) beschreibt die Anordnung der Apparatur. Es wurden die technischen Reinstgase CO (99,7 %, Linde, Deutschland) und CO<sub>2</sub> (99,9 %, Linde, Deutschland) und angesaugte Umgebungsluft verwendet. Diese wurden in Kolbenhub-Gasmischpumpen (Wösthoff, Bochum, Deutschland) zu den verschiedenen Verhältnissen gemischt. Die separaten Gasgemische wurden durch ein gasdichtes Schlauchsystem (Tygon<sup>TM</sup>, VWR, Deutschland) bei 37 °C angefeuchtet und in einen 37 °C Inkubator zu zwei Baugleichen Kammern geleitet, in denen jeweils neun 3,5 cm Kulturschalen oder zwei 6–24 Loch Kulturplatten inkubiert werden konnten. Zellkulturen wurden somit in Zellkulturschalen unter üblichen Bedingungen (37 °C, 4,75 % CO<sub>2</sub>, 100 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Begasungsanlage wurde auf ihre Funktionalität hin untersucht. Dazu wurden Hämolysate in 24-Lochplatten mit 0,097 % CO begast und die jeweilige Bindung von CO an Hämoglobin photometrisch gemessen. Es wurden die optischen Spektren der Hämolysate von 450–650 nm in einem Photometer (NanoDrop, NanoDrop Technologies) aufgenommen und der Anteil

an Carboxy-Hämoglobin mittels Dekonvolution berechnet.

### 2.5.1 Dekonvolution von Hämoglobinspektren

Die am häufigsten vorkommenden Arten von Hämoglobin (Hb) sind oxygeniertes (OxyHb) und desoxygeniertes Hb (DesoxyHb). In geringen Mengen existiert auch die oxidierte Form von Hb (MetHb) und im Falle einer CO Behandlung ist der Anteil an carboxyliertem Hb (COHb) entsprechend groß, da CO mit einer 200-fach größeren Affinität als O<sub>2</sub> an das Eisen des Häm im Hb bindet. Diese Formen von Hb lassen sich jeweils in charakteristischen Spektren der visuellen Absorption unterscheiden. Eine Mischung der genannten Formen von Hb liefert in der optischen Spektroskopie ein Mischspektrum, das sich aus den einzelnen Spektren zusammen setzt, wobei sich der Extinktionskoeffizient zu jeder Wellenlänge additiv zu den Extinktionskoeffizienten der Einzelspektren verhält. Durch Entfaltung (Dekonvolution) eines Mischspektrums lässt sich daher der jeweilige Anteil der Einzelspektren berechnen.

Humanes Vollblut (50 ml) wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  schockgefroren und nach dem Auftauen für 15 min bei 4500 g sedimentiert. Der erhaltene Überstand, das Hämolysat, wurde jeweils zu 100 % in die oxygenierte (OxyHb), desoxygenierte (DesoxyHb), carboxylierte (COHb) und oxidierte (MetHb) Form überführt und das jeweilige Spektrum von 450–650 nm mit einer Auflösung von 1 nm gemessen (Abb. 3.4(a)). Zur Herstellung von OxyHb wurde das Hämolysat an atmosphärischer Luft unter Schütteln inkubiert. DesoxyHb wurde unter Zusatz einer Spatelspitze Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) und MetHb mittels Kaliumhexacyanoferrat ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) erzeugt. Für die Generierung von COHb wurde das Hämolysat mit 100 % CO Gas für eine halbe Stunde durchgast. Nach Begasung von Hämolysat für eine Stunde in der Begasungsanlage wurden die Hb-Mischpektren ebenfalls von 450–650 nm aufgenommen.

Die Dekonvolution der jeweiligen Mischspektren in die Anteile der Einzelspektren von Hb wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Hb}_{\text{Mischspektrum}} = a \cdot \text{OxyHb} + b \cdot \text{DesoxyHb} + c \cdot \text{COHb} + d \cdot \text{MetHb}, \quad (2.1)$$

wobei für  $\text{Hb}_{\text{Mischspektrum}}$  das gemessene Spektrum nach Begasung und für OxyHb, DesoxyHb, COHb und MetHb die oben beschriebenen Reinspektren eingesetzt wurden. Die Gleichung wurde mittels nichtlinearer Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate für die Faktoren a–d optimiert, welche den prozentualen Anteil der jeweiligen Spektren im Mischspektrum darstellen.

## 2.6 Isolierung und Behandlung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)

PBMCs wurden nach dem Standardprotokoll für Dichtegradienten-Zentrifugation mit Biocoll entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert (Biochrom). Dazu wurden in 50 ml Kunststoffgefäßen (Sarstedt) 15 ml Biocoll Gradienten-Lösung mit Citrat-antikoaguliertem humanen Vollblut (35 ml) vorsichtig überschichtet. Nach Sedimentation für 20 Minuten bei 800 g (RT) wurden die Zellen aus der Zwischenschicht gesammelt und zweimal in PBS gewaschen (10 Minuten bei 600 g gefolgt von 10 Minuten bei 400 g), resuspendiert ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml) und in RPMI 1640-Medium (PAA, Pasching, Österreich), versetzt mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin (PAA), 100 U/ml Penicillin (PAA) und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin (PAA) kultiviert. Für die Induktion von HO-1 wurden die Zellen mit Hämin (15 und 30  $\mu\text{M}$ ; Frontier Scientific) oder Simvastatin (1 und 20  $\mu\text{M}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt, bevor sie lysiert wurden (Lysispuffer s. A.1) und mit Glycerin versetzt (50 %) entweder direkt für die Fluoreszenz-basierte HO-Aktivitätsmessung eingesetzt, oder bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert wurden.

### 2.6.1 Anreicherung von CD3-positiven Zellen aus PBMCs

Die Fraktionen der  $\text{CD3}^+$ - und  $\text{CD3}^-$ -T-Zellen wurden ausgehend von humanen PBMCs mittels MACS<sup>®</sup>-Technologie (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durch positive  $\text{CD3}^+$ -Selektion angereichert. Bei diesem Verfahren werden die



anzureichernden Zellen mit einem, gegen ein exklusiv auf diesen Zellen vorkommendes Epitop gerichteten, Antikörper markiert, der mit einem Micro-Magnet gekoppelt ist (MicroBead). In Säulen mit einem Eisenkern, der eine große Oberfläche aufweist, können mittels eines temporären starken Magnetfelds die markierten Zellen im Durchfluss zurückgehalten werden.

Zur Anreicherung der CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden human-CD3<sup>+</sup>-MACS<sup>®</sup> MicroBeads (Miltenyi) zur Markierung laut Herstellerangaben verwendet. In Säulen zur Positivselektion (MACS<sup>®</sup> MS Columns) wurden die CD3<sup>+</sup>-Zellen angereichert und der Durchfluss als CD3<sup>-</sup>-Fraktion gesammelt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Fraktionen durch Markierung mit einem anti-human-CD3-FITC Antikörper (BD-Biosciences, NJ, USA) analysiert und es ergab sich für beide Fraktionen jeweils eine Reinheit von über 98 %. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (PAA), versetzt mit 2 mM L-Glutamin (PAA), 100 U/ml Penicillin (PAA) und 100 µg/ml Streptomycin (PAA) für 3 Stunden kultiviert, bevor sie für die HO-Aktivitätsmessung lysiert (Lysispuffer s. A.1) wurden.

## 2.7 Luziferase Reporter Assay

Die im Promotor von mHo-1 lokalisierte E-Box (CACGTG) wurde mittels eines transienten Transaktivierungs-Assays auf ihre Funktionalität hin untersucht. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende DNA-Fragment in einen Reportervektor vor die Promotorsequenz eines Luziferasegens kloniert. Dieses Plasmid führt nach Transfektion in tierische Zellen zu einer geringen Basalexpression von Luziferase. Nach Kotransfektion mit weiteren Konstrukten, die zu einer konstitutiven Expression von entsprechenden Transkriptionfaktoren führen, erfolgt eine Steigerung der Luziferaseexpression, wenn das DNA Fragment ein Ziel für diese Transkriptionfaktoren darstellt. Die Luziferase katalysiert die Umwandlung von Luziferin zu Oxyluziferin unter Freisetzung von Lichtquanten. Die Unterschiede in der Intensität dieser Chemilumineszenz in den verschiedenen Probenansätzen wird zur Quantifizierung der Luziferaseexpression herangezogen.

### 2.7.1 Klonierung des *mHo-1* Promotors

Die  $-1000$  bp Region des murinen Ho-1 Gens, beginnend innerhalb der 5'UTR, wurde mittels PCR unter Standardbedingungen aus genomischer Maus DNA amplifiziert und in den Glühwürmchen Luziferase pGL3prom Vektor (Promega) vor den enthaltenen minimal-SV40 Promotor kloniert. Dazu wurden spezifische PCR-Primer mit entsprechenden Basenüberhängen erstellt um Schnittstellen für die Endonukleasen *KpnI* und *NheI* zu generieren. Die amplifizierte DNA wurde in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und mit einem Gel-Extraktions-Kit (QIAquick, Qiagen) aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA und der Vektor pGL3prom wurden mit den Endonukleasen *KpnI* und *NheI* geschnitten, mit dem Quick Ligation Kit (New England Biolabs) ligiert (pGL3/Ho1p-1000), in *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetente Zellen transformiert und auf festem LB-Medium mit Ampicillin selektiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen) isoliert und die Sequenz der inserierten DNA mittels Sequenzierung (MWG, Deutschland) verifiziert.

### 2.7.2 Mutagenese der E-Box im HO-1 Promotor

Die Sequenz der im HO-1 Promotor enthaltenen, natürlichen E-Box (CACGTG), wurde im Plasmid pGL3-Ho1p-1000 mittels ortsspezifischer Mutagenese in Anlehnung an Gekakis et al. [1998] zu der Basenabfolge TTTAGT verändert. Die Mutagenese wurde nach Herstellerangaben mit dem Kit QuickChange<sup>®</sup> II (Stratagene) durchgeführt. Es wurde der Primer 5'-CCGGCTCAGCTGGGCGGCCACTTTAGTACCCGCGTACTTAAAGGGCTG-3' und dessen rückwärts komplementärer Primer zur Mutagenese eingesetzt. Die Plasmid-DNA (pGL3/Ho1p-1000mut-Luc) wurde in *E. coli* XL1-Blue kompetente Zellen transformiert und auf festem LB-Medium mit Ampicillin selektiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen) isoliert und die Sequenz in Bezug auf die Mutagenese mittels Sequenzierung (MWG, Deutschland) verifiziert.

### 2.7.3 Transiente Transfektion und Transaktivierungs-Assay

Zur Messung der E-Box-Transaktivierung wurde das Dual-Luziferase-Reporter-Assay System von Promega verwendet. Durchgeführt wurde diese Methode am Institut für Chronobiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin unter Anleitung von Sabrina Wendt. HEK 293 Zellen wurden in Phenolrot freiem DMEM (Gibco), supplementiert mit 10 % FKS und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco), kultiviert. 24 Stunden vor Transfektion wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in 24-Loch Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben mit Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) mit den entsprechenden Vektoren transient transfiziert. Es wurden je 50 ng Luciferase-Reportervektor pGL3/Ho1p–1000-Luc bzw. pGL3/Ho1p–1000mut-Luc und 2 ng Kontroll-Luziferase-Reporter (phRL-SV40, Renilla Luziferase) eingesetzt. Die Kotransfektion mit dem Kontroll-Plasmid diente der Minimierung der Variabilität in der Lumineszenz-Messung durch Unterschiede in Zellzahl und Transfektionseffizienz. Für die Expression der für die E-Box-Transaktivierung und -Repression essentiellen Uhrgene wurden die entsprechenden pDEST-Vektoren eingesetzt (pDEST26/Clock (300 ng), pDEST26/Bmal1 (300 ng), pDEST26/Cry1 (30 ng)). Alle Transfektionsansätze wurden mit pDEST26 auf 1,2  $\mu$ g DNA pro Ansatz eingestellt. Die transfizierten Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, laut Herstellerangaben lysiert und für mindestens eine Stunde bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die jeweilige Luziferaseaktivität wurde mit jeweils 5  $\mu$ l der Zelllysate nach zeitlich getrennter Zugabe der Luziferase-Substrate (Leuchtkäfer-Luziferase und Renilla-Luziferase) durch Messung der jeweiligen Lumineszenz für 10 Sekunden in einem Luminometer (Infinite M200; TECAN) in Doppelbestimmungen quantifiziert. Das Hintergrundsignal der Lumineszenz wurde in untransfizierten Zellen detektiert und von jedem Ansatz subtrahiert.

## 2.8 Statistik

Eine hierarchische Ballungsanalyse der Micro-Array Genexpressionsdaten wurde mit der Software Cluster 3.0 von Michael Eisen (Eisen Lab, UBC, USA) durchgeführt und mittels des Programms TreeView visualisiert [Eisen et al., 1998].

Von Messdaten wurden die arithmetischen Mittel  $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.2)$$

und Standardabweichungen  $\sigma$  der Zufallsvariablen  $\bar{x}$

$$\sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.3)$$

gebildet. Die Fehler der arithmetische Mittel wurden bei weiteren Berechnungen, wie Normalisierungen und Relativierungen nach speziellen Fällen der Gaußschen Fehlerfortpflanzung von Doerffel berechnet. Die Standardabweichungen  $\sigma_z$  für die Produkte oder Quotienten  $z$  aus  $x$  und  $y$  bildeten sich demnach:

$$\text{bei } z = x \cdot y, \quad \text{bzw. } z = \frac{x}{y} : \quad \left(\frac{\sigma_z}{z}\right)^2 = \left(\frac{\sigma_x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_y}{y}\right)^2. \quad (2.4)$$

Zur Überprüfung der Signifikanz zweier unabhängiger Verteilungen aus einer Grundgesamtheit wurde der Mann-Whitney-U-Test für parameterfreie, ungepaarte Daten angewandt. Als Signifikanzniveau wurde 5 bzw. 1 % ( $p < 0,05$ , bzw.  $p < 0,01$ ) angenommen.

Die Signifikanz von circadianen Oszillationen wurden mittels CircWave V1.4 von Roelof A. Hut (Universität Groningen, Niederlande) durchgeführt. CircWave analysiert

unabhängige circadiane Daten, indem es die einzelnen Datenpunkte an eine harmonische sinusidale Funktion angleicht und diese mittels eines F-Tests auf Signifikanz analysiert. Die Angleichung der Daten erfolgt durch eine lineare harmonische Regression. Das bedeutet, dass eine Sinuskurve an die Daten angeglichen, und die Signifikanz gegen eine horizontale lineare Regression aller Daten getestet wird. Die grundlegende Welle wird durch die Funktion

$$f(t) = a + \sum_{i=1}^{\infty} \left[ p_i \sin i2\pi \frac{t}{\tau} + q_i \cos i2\pi \frac{t}{\tau} \right], \quad (2.5)$$

beschrieben, mit  $t$  = der Zeit,  $f(t)$  der berechneten Funktion zum Zeitpunkt  $t$  und  $a$  = dem arithmetischen Mittel der Daten. Die Funktion beschreibt die Summe der  $i$ -ten, mit  $p_i$  als Sinus- und  $q_i$  als Cosinuskoeffizient der  $(i - 1)$ -ten harmonischen Welle.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

Dieses Kapitel ist in zwei Teile gegliedert. Der erste Teil beinhaltet die Ergebnisse und Beschreibungen von etablierten und optimierten Methoden, die für die Durchführung der Experimente in dieser Arbeit erforderlich waren.

Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der im Eingangskapitel erläuterten wissenschaftlichen Fragestellung, bezüglich der genregulatorischen Eigenschaften von CO und induzierter HO-1 vorgestellt (S. 55ff).

### 3.1 Teil I der Ergebnisse

#### Etablierungen und Optimierungen

Es wurden für die Durchführung dieser Arbeit einige Methoden neu etabliert, bzw. optimiert. Darunter wird in den folgenden Abschnitten ein Vergleich der Effizienz und Reproduzierbarkeit verschiedener Protokolle der cDNA-Synthese (3.1.1), die Optimierung der Präparation von murinen Hepatozyten (3.1.2), die Etablierung einer Begasungsanlage für Zellkulturen (3.1.3) und die Etablierung einer neuen sensitiven Messmethode für die enzymatische HO-1 Aktivität (3.1.4) beschrieben.

### 3.1.1 cDNA-Synthesen mit unterschiedlichen Primern

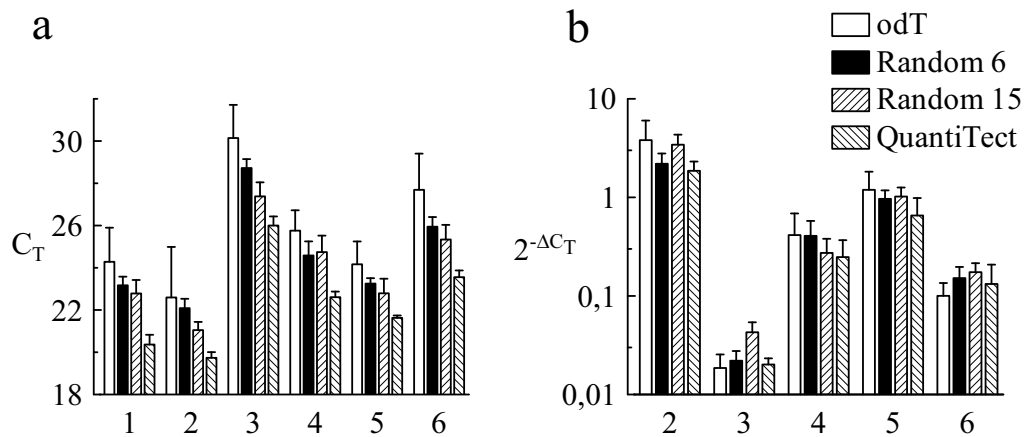
Die Messung der Amplifikation von cDNA Fragmenten mittels Real-Time PCR ist eine sehr exakte und reproduzierbare Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression. Allerdings sind die methodischen Prozeduren, wie die Extraktion der RNA und insbesondere die Synthese von cDNA, die kritischen Schritte, die den systematischen Fehler erhöhen, bei dem Versuch ein Abbild der mRNA Expression in der Zelle widerzuspiegeln. Da die Real-Time RT-PCR eine der Hauptmethoden in dieser Arbeit darstellt, wurde untersucht, inwiefern verschiedene Protokolle der cDNA Synthese einen Einfluss auf (i) die jeweilige Ausbeute der synthetisierten cDNA und (ii) die verhältnismäßige Qualität bezüglich der abgebildeten Expression unterschiedlicher Gene haben.

Es existieren verschiedene Protokolle zur Synthese von cDNA aus gesamt RNA. Diese Protokolle unterscheiden sich primär in der Anwendung unterschiedlicher Oligonukleotide, die als Synthesepimer dienen. Die am häufigsten verwendeten Primer sind „Oligo desoxy-Thymidine“ (odT), bestehend aus 15 Thymidinen, und „Random Hexamere“ (Random 6), die sich aus einem homogenen Gemisch aus jeweils sechs zufällig angeordneten Nukleotiden zusammensetzen. Bei Stangegaard et al. [2006] wird gezeigt, dass durch Random Primer mit einer Länge von 15 Nukleotiden (Random Pentadecamere; Random 15) im Gegensatz zu Random 6 eine signifikant höhere Ausbeute von cDNA erreicht wird. Des weiteren bietet die Firma Qiagen ein kommerzielles Syntheseprotokoll (QuantiTect®) an, welches sich aus einer Mischung von odT- und Random 6 Primern zusammensetzt.

Diese vier cDNA-Syntheseprotokolle wurden jeweils für sechs gesamt RNAs angewandt, die aus Lebern naiver C57Bl/6 Mäuse extrahiert wurden. Mittels TaqMan®-Real-Time PCR für die relative Quantifizierung von sechs verschiedenen mRNA Transkripten wurden die cDNAs auf ihre Effizienz ( $C_T$ -Wert)<sup>1</sup> und die relative, zum Referenzgen

---

<sup>1</sup>PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität einen definierten Schwellenwert übersteigt, der sich signifikant vom basalen Fluoreszenz-Rausch-Signal abhebt



**Abb. 3.1: Einfluss verschiedener cDNA Syntheseprotokolle auf die relative Quantifizierung der Genexpression.**

Die Effizienz der Synthese von cDNA aus gesamt RNA (murine Leber;  $n = 6$ ) wurde für vier verschiedene Syntheseprotokolle untersucht. Für sechs verschiedene mRNA-Transkripte (1–6) wurde eine Real-Time PCR durchgeführt. **(a)**  $C_T$ -Werte der Real-Time PCR für die unterschiedlichen Transkripte. **(b)** Relative Quantifizierung der Genexpression ( $2^{-\Delta C_T}$ ) der Gene 2–6 bezogen auf *mHprt1* (Gen 1). Weitere Erklärungen im Text. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

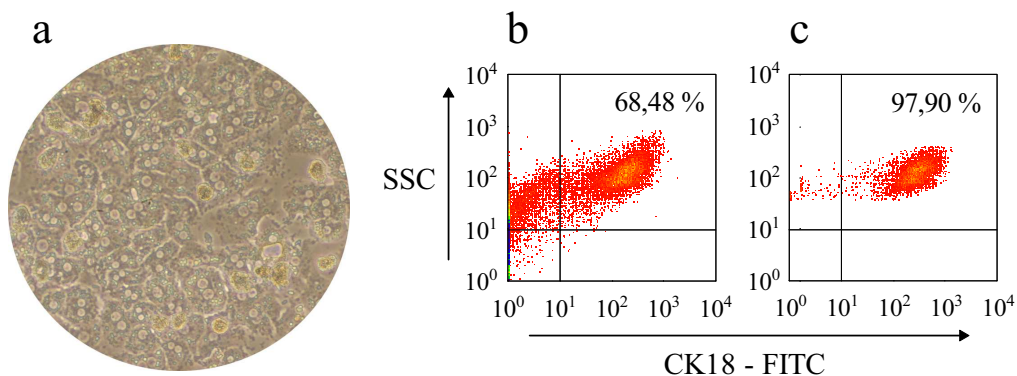
*mHprt1* (Gen 1) normalisierte, Expression ( $2^{-\Delta C_T}$ ) verglichen (Abb. 3.1).

Es konnte gezeigt werden, dass die cDNA-Synthese mit dem QuantiTect®-Protokoll bei allen untersuchten Transkripten die höchste Effizienz und Reproduzierbarkeit in der Real-Time PCR aufwies. Die  $C_T$ -Werte waren hier ca. 1–2 PCR-Zyklen geringer, als bei der PCR mit den cDNAs, die durch das Random 6 und -15 Syntheseprotokoll generiert wurden, und sogar ca. 2–4 PCR-Zyklen geringer als bei der Anwendung der odT-Primer synthetisierten cDNAs (Abb. 3.1(a)). Außerdem ergaben sich hier im Vergleich zu den anderen Syntheseprotokollen wesentlich geringere Standardabweichungen. Die Normalisierung der Expression der Transkripte 2–6 zum Transkript 1 ( $2^{-\Delta C_T}$ ) zeigte ein nahezu vergleichbares Ergebnis für alle vier Protokolle der cDNA-Synthese (Abb. 3.1(b)). Diese Ergebnisse führten dazu, dass in dieser Arbeit zur cDNA-Synthese vorzugsweise das Protokoll des kommerziellen QuantiTect®-Kits angewandt wurde.



### 3.1.2 Vereinfachte Methode zur Präparation primärer muriner Hepatozyten

Die Aufreinigung und Kultivierung von primären Hepatozyten wurde nach einer modifizierten Methode von Seglen [1976] durchgeführt. Nach diesem Protokoll werden die Tiere narkotisiert und erst während der Perfusion der Leber getötet. In dieser Arbeit wurde eine kürzere und einfachere Prozedur etabliert, indem die Tiere unmittelbar vor der Bauchraumöffnung durch zervikale Dislokation getötet wurden. Auf eine aufwändige Apparatur mit direkter Temperierung der Perfusionsmedien wurde verzichtet. Anstelle dessen wurden die Medien kurz vorher auf 37 °C erwärmt und die Lebern durch ein Zweikanal-Schlauchsystem mittels 20 ml Spritzen durch die Pfortader perfundiert. Diese Vorgehensweise verkürzte die Zeit von der Tötung der Maus bis zum Zeitpunkt des ersten Zentrifugationschrittes von ca. einer Stunde auf die Dauer von 15 Minuten. Außerdem konnte durch einen weiteren Aufreinigungsschritt bei niedriger relativer Zentrifugationskraft (insgesamt dreimal Sedimentation bei 40 g, 5 Minuten) eine Reinheit bis 98 % erreicht werden (Abb. 3.2(b, c)). Die Ausbeute der



**Abb. 3.2: Primäre Maus-Hepatozyten wurden bis zu 98 % Reinheit isoliert.**

(a) Kultivierte murine primäre Hepatozyten, 24 Stunden nach Isolation (200-fache Vergrößerung). (b–c) Durchflusszytometrische Analyse der Leberzellsuspensionen (b) vor und (c) nach der Anreicherung der Hepatozyten. Die Zellen wurden direkt nach Behandlung mit Kollagenase und nach den folgenden drei Anreicherungschritten (Sedimentation bei 40 g) intrazellulär mit Cytokeratin-18-FITC gekoppeltem Antikörper (CK18-FITC) markiert und die Fluoreszenzintensität gegen die jeweilige Granularität (SSC) dargestellt. Die Population der Hepatozyten betrug in der gesamt Leberzellsuspension ca. 68 % und nach der Anreicherung ca. 98 %.

isolierten Hepatozyten pro Leber schwankte zwischen 20–30 Millionen Zellen, mit einer Vitalität von über 90 %. Die Zelladhäsion auf Gelatine beschichteten Zellkulturschalen war vergleichbar mit der auf Kollagen, wobei die Konfluenz der Zellen im Mittel zwischen 80–90 % betrug (Abb. 3.2(a)).

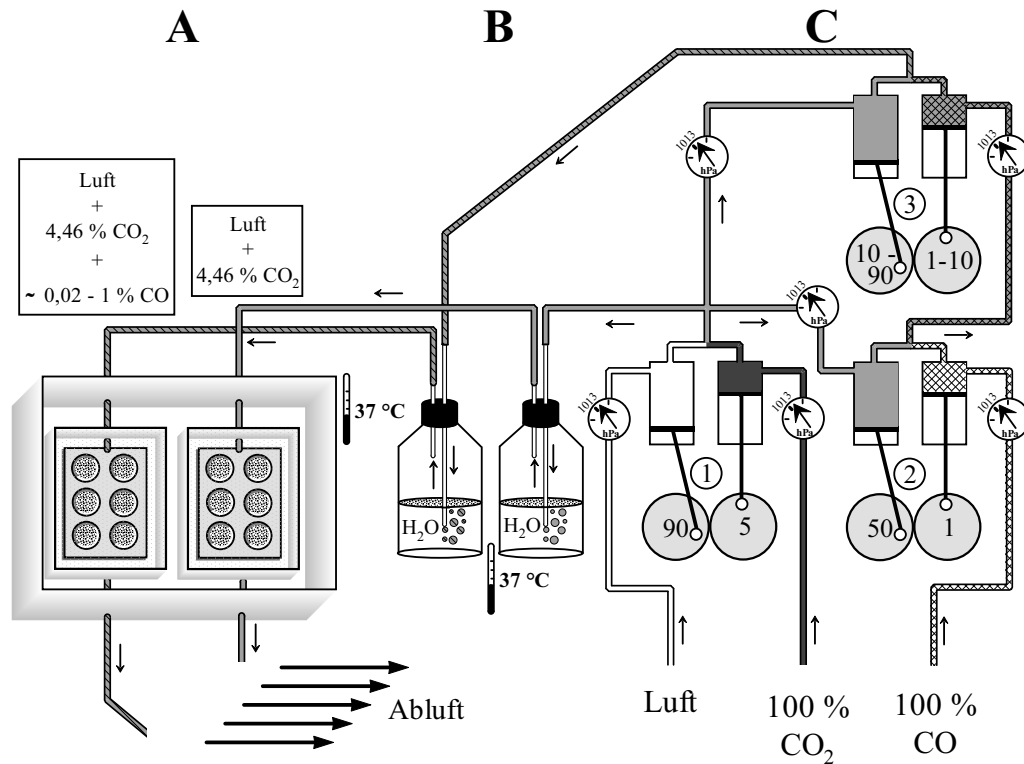
### **3.1.3 Etablierung einer Apparatur zur Begasung von Zellkulturen mit Kohlenmonoxid**

Zur Untersuchung der Signalfunktionen von CO in Kulturen von primären Hepatozyten wurde ein System etabliert, in dem die Zellen unter standardisierten Kulturbedingungen mit reinem CO in verschiedenen Konzentrationen behandelt werden konnten. Dabei galt erstens der Anspruch die Gasmischungen aus reinem CO-Gas zu mischen, ohne industriell hergestellte Vormischungen zu verwenden, die in ihrer Zusammensetzung bezüglich der Nebenbestandteile variieren können. Zweitens sollte eine zeitgleiche Behandlung von Kontrollzellen mit dem selben Trägergas gewährleisten, dass die verursachten Effekte ausschließlich eine Folge des beigemischten CO sind.

#### **Beschreibung der CO Begasungsanlage**

Es wurde ein System etabliert, in dem CO begaste Zellen, sowie Kontrollzellen unter den gleichen Bedingungen kultiviert werden konnten. Mittels Kolbenhubpumpen (Wösthoff, Bochum, Deutschland) wurde ein Trägergas aus Umgebungsluft und CO<sub>2</sub> hergestellt (ca. 74,1 % N<sub>2</sub>, 19,9 % O<sub>2</sub> und 4,75 % CO<sub>2</sub>), welches für die Kontrollzellen direkt eingesetzt und für die behandelten Zellen mit dem technische Reinstgas CO (99,7 %), zu den jeweiligen Konzentrationen verdünnt, gemischt wurde. Die Gase und Gasmischungen wurden vor jedem Pumpeneingang durch Überdruckgefäße geleitet, die unerwünschte Unterdrücke, somit falsche Mischungsverhältnisse, verhinderten. Die Gasgemische für die Kontroll- und CO-behandelten Zellen wurden zur Wasserdampfsättigung jeweils durch Wasser (37 °C) und anschließend in baugleiche Kammern (ca. 1200 cm<sup>3</sup>) geleitet, die in einem Brutschrank (37 °C) inkubiert wurden. Es gelangte demnach, abzüglich

des Wasserdampfpartialdruckes bei 37 °C von 47 mmHg, bzw. 6,2 %, ein Trägergas mit ca. 69,52 % N<sub>2</sub>, 18,57 % O<sub>2</sub>, und 4,46 % CO<sub>2</sub> in die Kammern, zuzüglich der jeweiligen CO-Beimischung in die CO-Kammer. In Abbildung 3.3 ist die schematische Anordnung der Apparatur beschrieben.



**Abb. 3.3: Schema der Apparatur zur Begasung von Zellkulturen.**

Die Abschnitte A–C unterteilen die Begasungsanlage in drei Untereinheiten: (A) Zellkulturkammern, (B) Wasserdampfsättigung und (C) Gasmischung. Gasgemische wurden mittels Kolbenpumpen (Wösthoff, Bochum) hergestellt, welche die Volumina der einzelnen Gase in baugleichen Kolben durch einstellbare Hubgeschwindigkeiten mischen (C). Pumpe ① mischte ein Trägergas aus angesaugter, getrockneter Umgebungsluft und dem technischen Gas CO<sub>2</sub> (99,9 %) in einem Verhältnis 90 : 5 ( $\cong$  4,75 % CO<sub>2</sub>), welches 1. als Kontrollgas und 2. für die weitere Beimischung von CO in den Pumpen ② und ③ verwendet wurde. In Pumpe ② wurde das Trägergas mit dem technischen Gas CO (99,7 %) im Verhältnis 50 : 1 ( $\cong$  1,96 % CO) gemischt und das CO im weiteren Verlauf in Pumpe ③ zu den fraktionellen Anteilen von 0,019 % bis 0,98 % verdünnt. Vor Einlass in die jeweiligen Kolben wurde durch Überdruckgefäße der zureichende Nachschub der Gase gewährleistet, um Unterdrücke, somit falsche Mischungsverhältnisse zu verhindern. Die gemischten Gase wurden zur Wasserdampfsättigung bei 37 °C durch Wasser (B), und anschließend in einem Inkubator bei 37 °C in zwei identische Kammern geleitet, die mit Zellkulturschalen bestückt werden konnten. Die Kammern verfügten über einen Auslass, welcher in einem Abzug der Abluft zugeführt wurde (A). Pfeile zeigen die Richtung des Gasflusses an.

**CO-Begasung ist nach einer Stunde im Equilibrium**

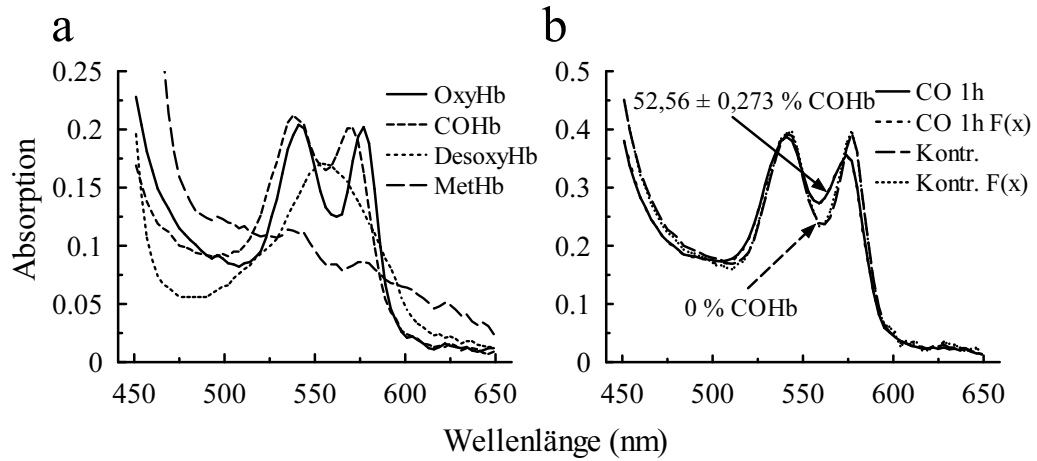
Im Folgenden wurde die Funktionalität der CO-Begasungsanlage in Bezug auf die Equilibrierung der gelösten Konzentration von CO in Medium innerhalb der jeweiligen Begasungskammern untersucht. Dazu wurde ein Hämolysat aus Vollblut hergestellt und in Zellkulturplatten in der Anlage begast. Das Hämolysat diente als Indikator für die Sättigung mit CO, da dieses durch das Hämoglobin in Hämolysat mit einer ca. 228-fach höheren Affinität als O<sub>2</sub> gebunden wird [Ernst und Zibrak, 1998]. Die optischen Spektren des Hämoglobins im Hämolysat unterscheiden sich, je nach Ligand (CO, bzw. O<sub>2</sub>) oder Redox-Zustand des Eisenatoms der Hämgruppe, charakteristisch voneinander. Mittels Dekonvolution (siehe 2.5.1) eines gemessenen Spektrums von Hämolysat aus der Begasungsanlage konnten die Anteile der Einzelspektren berechnet, und dadurch die Sättigung mit CO bestimmt werden (Abb. 3.4).

Die durch nicht-lineare Regression berechneten Spektren  $F(x)$ , die sich aus den jeweiligen Anteilen der Einzelspektren von OxyHb, DesoxyHb, COHb und MetHb zusammensetzen (Abb. 3.4a), korrelierten hoch signifikant ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,998$ ) mit den gemessenen Mischspektren (Abb. 3.4b). Nach einer Stunde Begasung mit 0,091 % CO konnte ein durchschnittlicher Anteil an COHb von  $52,56 \% \pm 0,273 \%$  im Hämolysat nachgewiesen werden. In den jeweiligen Kontrollansätzen wurde kein signifikanter Anteil an COHb detektiert. Der jeweilige restliche Anteil wurde ausschließlich von OxyHb ausgemacht (Desoxy- und MetHb = 0 %). Das Verhältnis von COHb zu OxyHb war damit ca. 1,1.

Die relative Affinität  $K$  von CO/O<sub>2</sub> zu humanem Hämoglobin beträgt ca. 228 [Ernst und Zibrak, 1998] und ist definiert durch:

$$K = \frac{(COHb)}{(O_2Hb)} \times \frac{(O_2)}{(CO)}, \quad (3.1)$$

mit (COHb) und (O<sub>2</sub>Hb) den Anteilen von Hb, die das jeweilige Gas gebunden haben und den jeweiligen Partialdrücken der Gase (CO) und (O<sub>2</sub>). Unter Verwendung der im Experiment eingesetzten Partialdrücke von CO und O<sub>2</sub> und dem Verhältnis (COHb)



**Abb. 3.4: CO Begasung nach einer Stunde im Equilibrium.**

Hämolysat wurde in der Begasungsanlage für eine Stunde mit CO (Luft + 4,46 % CO<sub>2</sub> + 0,091 % CO), und für die Kontrollen ohne Zusatz von CO, begast. Mittels jeweiliger Dekonvolution des Mischspektrums in die Einzelspektren wurde der prozentuale Anteil an carboxyliertem Hämoglobin berechnet. **(a)** Verschiedene optische Spektren von Hämoglobin (Hb) in Hämolysat wurden zur Berechnung eingesetzt: oxygeniertes Hb (OxyHb, Equilibrierung mit atmosphärischer Luft), carboxyliertes Hb (COHb, Equilibrierung mit 100 % CO), desoxygeniertes Hb (DesoxyHb, Zusatz von Natriumdithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)) und oxidiertes Hb (Methämoglobin, MetHb, Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>])). **(b)** Darstellung einer repräsentativen Messung optischer Spektren (n = 4). Die Mischspektren von begastem Hämolysat und die jeweilig durch nicht-lineare Regression berechneten Spektren (F(x)) korrelieren hoch signifikant (p < 0,001, r = 0,998). Der Anteil an COHb beträgt für die CO begasten Ansätze 52,56 % ± 0,273 %. Für die Spektren der Kontrollen wurde ein nicht signifikanter Anteil an COHb von 8,2 · 10<sup>-3</sup> ± 6,2 · 10<sup>-3</sup> % berechnet. Die berechnete relative Affinität von 226 (siehe Text) zeigt an, dass sich das System im Gleichgewicht befindet.

und (O<sub>2</sub>Hb) der Messung von 1,1 ergibt sich eine relative Affinität von 226, was bezüglich des Literaturwertes von 228 anzeigt, dass sich das System im Gleichgewicht befindet.

Weiterhin wurde berechnet, welche Konzentration von gelöstem CO im Medium vorliegt. Durch die Anwendung des Gesetzes von Henry als eine Funktion der Temperatur

$$k_H = k_H^\ominus \times \exp \left( \frac{-d \ln k_H}{d(1/T)} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T^\ominus} \right) \right) = \frac{c}{p} \quad (3.2)$$

konnte durch die bekannte Henry Konstante  $k_H^\ominus$  von 9,9 · 10<sup>-4</sup> M/atm für CO bei 298,15 K und der temperaturabhängigen Lösungsenthalpie  $\frac{-d \ln k_H}{d(1/T)}$  von 1300 K [Lide

und Frederikse, 1995] die Henry Konstante für 310,15 K, also 37 °C,  $k_{\text{H}}^{310\text{K}}$  von  $8,4 \cdot 10^{-4} \text{ M/atm}$  berechnet werden. Mit dieser wurde die Konzentration  $c$  von gelöstem CO für den jeweiligen Partialdruck  $p$  nach dem Gesetz von Henry

$$k_{\text{H}}^{310\text{K}} = \frac{c}{p} \quad (3.3)$$

berechnet. Somit ergab sich eine Konzentration von  $0,76 \mu\text{M}$  für CO im Medium bei einer Begasung mit 0,091 % CO bei 37 °C.

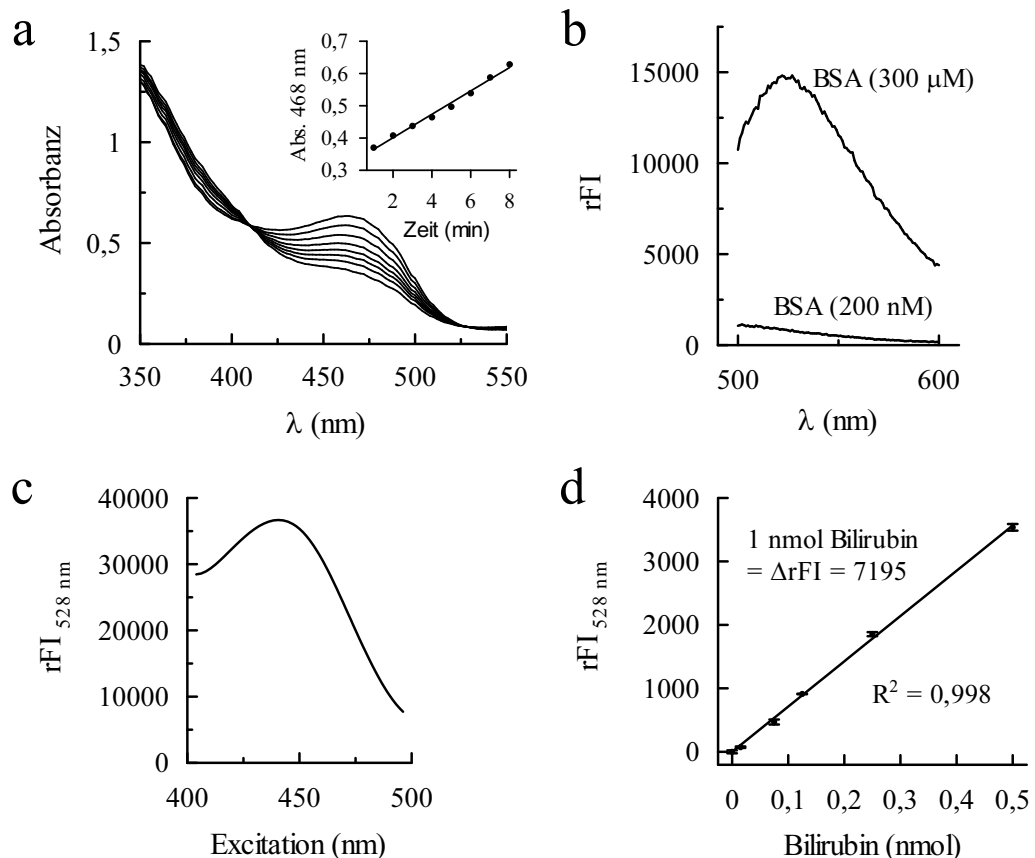
### 3.1.4 Echtzeit-Messung der HO Aktivität mittels Fluoreszenz von gebildetem Bilirubin

Die bis zum heutigen Zeitpunkt publizierten und angewandten Methoden zur Messung der enzymatischen HO Aktivität in Lysaten sind entweder nicht hinreichend sensitiv, oder sind sehr aufwändig, benötigen spezielles Equipment und eignen sich daher nicht für den Durchsatz einer größeren Anzahl von Proben. Daher wurde in dieser Arbeit eine Methode etabliert, die diese Kriterien erfüllt.

Der methodische Ansatz beruht auf Fluoreszenzeigenschaften von BR [Athar et al., 1999; Beaven et al., 1974] und ermöglicht die Echtzeit-Messung von gebildetem BR während der enzymatischen Degradierung von Hämin durch HO. Hämin wurde in einer *in vitro* Reaktion, mittels der zu untersuchenden enzymatischen Aktivität von HO (in Lysaten enthalten, oder rekombinante HO-1), zu BV konvertiert. Zur Katalyse von BV zu BR wurde eine rekombinante BVR generiert, deren Aktivität zuvor charakterisiert wurde.

#### Ein rekombinantes Enzym als Quelle für BVR Aktivität

Standardgemäß wird für eine *in vitro* Katalyse von BV zu BR ein Zytosol-Extrakt aus Lebern von Ratten verwendet [Maines, 1992]. In diesem ist die BVR-Aktivität pro Volumen relativ gering und längerfristig trotz Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  instabil. Deshalb



**Abb. 3.5: Aktive rekombinante BVR: gebildetes BR fluoresziert in Verbindung mit BSA.**

(a) Lysat aus rBVR überexprimierenden Bakterien wurde bezüglich der enzymatischen Aktivität, der Katalyse von BV zu BR, spektralphotometrisch analysiert. Die Absorbanz wurde minütlich im Bereich von 350–550 nm gemessen und die Zunahme bei 468 nm gegen die Zeit aufgetragen (kleiner Graph). Die Berechnung der Aktivität ergab  $1,04 \mu\text{mol/h} \cdot \text{mg}$ . (b) Geringe Intensität des Fluoreszenzspektrums (500–600 nm, Anregung bei 441 nm) der Reaktion aus (a) mit 200 nM BSA. Eine Erhöhung der BSA Konzentration auf 300  $\mu$ M steigerte diese ca. 20-fach und das Spektrum zeigte die charakteristische Form eines BR:BSA Komplexes mit einem Maximum bei 528 nm. (c) Die optimale Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzmessung beträgt 441 nm. (d) Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Menge an BR im Komplex mit BSA (300  $\mu$ M). Die Auflösung beträgt 140 fmol pro rel. Fluoreszenzeinheit. Lineare Regression mit  $R^2 = 0,998$  ( $n = 5$ ). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

wurde für ein standardisiertes Verfahren zur HO-Aktivitätsmessung eine rekombinante BVR hergestellt, die konzentrierter eingesetzt werden kann und eine höhere Stabilität aufweist.

Dazu wurde die kodierende Sequenz des BVR Gens der Ratte (Anhang B.1.2) in ein

bakterielles Expressionsplasmid (pASK-IBA6) kloniert (Anhang B.1.1), in *E. coli* überexprimiert und aus diesen Bakterien ein Lysat hergestellt. Die Aktivität der BVR im Lysat wurde mittels Zunahme der Absorbanz im optischen Spektrum bei 468 nm charakterisiert (Abb. 3.5a). Dabei ergab sich unter der Verwendung des dekadischen molaren Absorptionskoeffizienten von  $60 \text{ l}/\text{mM} \cdot \text{cm}$  eine Aktivität von  $1,04 \text{ } \mu\text{mol}/\text{h} \cdot \text{mg}$ .

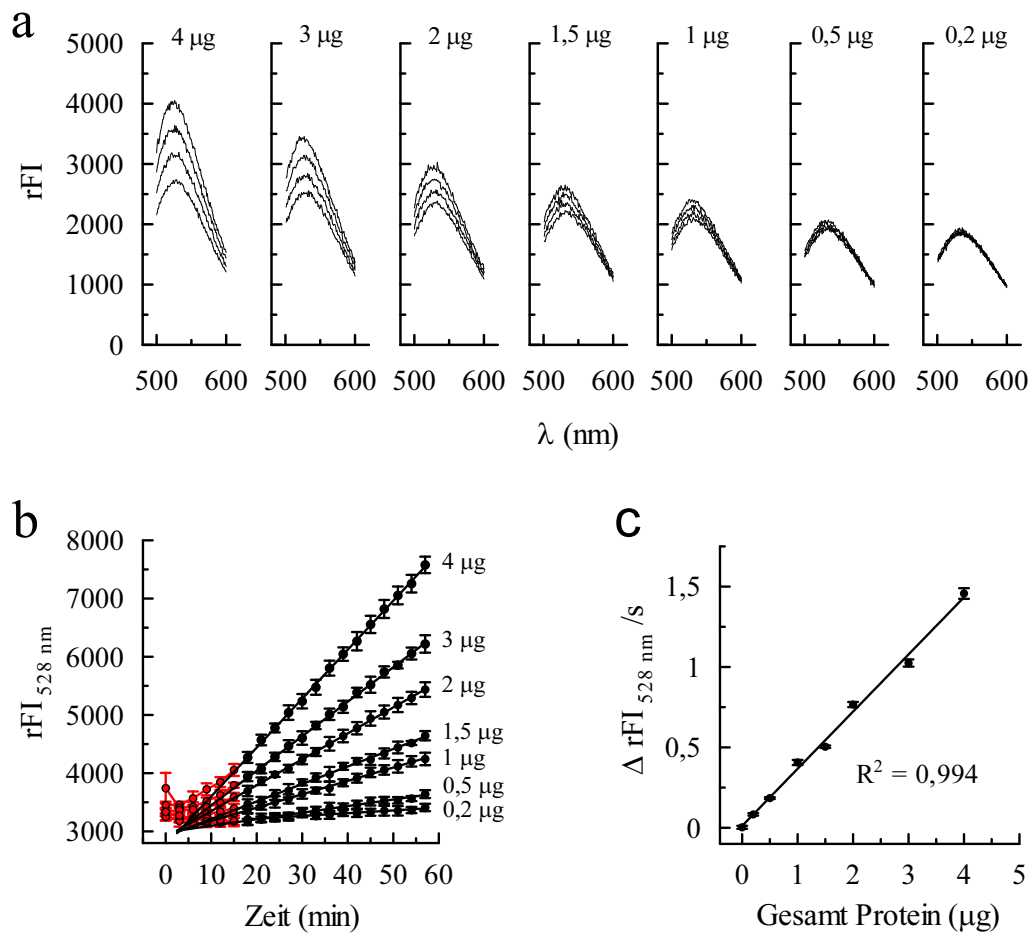
### Fluoreszenz zur Detektion von Bilirubin

Um die fluoreszierenden Eigenschaften von enzymatisch gebildetem BR zu untersuchen, wurde eine *in vitro* Reaktion von BV zu BR unter Verwendung rekombinanter BVR für 30 Minuten durchgeführt und die relative Fluoreszenzintensität (rFI), nach Anregung mit Licht der Wellenlänge von 468 nm, im Spektrum von 500–600 nm gemessen (Abb. 3.5b). Mit einer Konzentration von 200 nM BSA, welches zur besseren Löslichkeit von BR in wässriger Lösung standardgemäß bei dieser Reaktion enthalten ist [Tenhunen et al., 1968], war eine geringe Fluoreszenz detektierbar. Diese konnte durch Erhöhung der BSA Konzentration auf 300  $\mu\text{M}$  ca. 20-fach gesteigert werden, und das Spektrum zeigte die für einen BR:BSA Komplex charakteristische Form mit einem Maximum bei 528 nm, wie es bei Athar et al. [1999] beschrieben wurde. Weiterhin wurde in diesem Reaktionsansatz die optimale Anregungswellenlänge von 441 nm detektiert, welche die höchste Fluoreszenz bei 528 nm induziert (Abb. 3.5c). Die Menge an BR in einem Ansatz mit BSA (300  $\mu\text{M}$ ) und Hämin (15  $\mu\text{M}$ ) korreliert proportional zur detektierten rFI (Abb. 3.5d). Dabei entspricht eine Veränderung der BR Menge von 1 nmol einem  $\Delta\text{rFI}$  von  $7,2 \cdot 10^3$ , und ermöglicht somit die Detektion von 140 fmol BR pro Veränderung einer rFI-Einheit.

### Fluoreszenz-basierte Messung der Aktivität von rekombinanter HO-1

Zur Etablierung einer Fluoreszenz-basierten Detektion der Aktivität von HO wurde eine rekombinante verkürzte humane HO-1 (hHO-1-trunc), in Anlehnung an ein beschriebenes Protein [Wilks et al., 1995], generiert. Dazu wurde die kodierende Sequenz (kodierend für die Aminosäuren 1–265) des humanen *Ho-1*-Gens in ein





**Abb. 3.6:** Echtzeit-Fluoreszenzmessung der Aktivität rekombinanter verkürzter humaner HO-1.

Die zeitliche Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität (rFI) ist abhängig von der Menge an rekombinanter hHO-1-trunc. Periplasmatischer Extrakt hHO-1-trunc überexprimierender Bakterien wurde *in vitro* für die Konvertierung von Hämin zu BR in verschiedenen Mengen von 0,2–4  $\mu\text{g}$  eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde über 60 Minuten in Intervallen von 3 Minuten detektiert. **(a)** Repräsentative Fluoreszenzspektren von 500–600 nm (Zeitintervalle von 9 Minuten) der Reaktionen unterschiedlicher Mengen von hHO-1-trunc. **(b)** Enzymkinetiken der Reaktionen aus (a) mit der Fluoreszenzintensität bei 528 nm. Rote Datenpunkte wurden von der jeweiligen linearen Regression ausgeschlossen. **(c)** Direkt proportionale Abhängigkeit der zeitlichen Änderung der relativen Fluoreszenzintensität bei 528 nm zur Menge an hHO-1-trunc ( $R^2 = 0,995$ ;  $n = 5$ ). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

bakterielles Expressionsplasmid (pASK-IBA6) kloniert (Anhang B.2) und in *E. coli* überexprimiert. Das bei der Überexpression in den periplasmatischen Raum transportierte Protein wurde mittels Periplasma-Extraktion isoliert. Die Verwendung verschiedener Mengen dieses Extraktes in einer Reaktion mit Hämin (15  $\mu\text{M}$ ) als

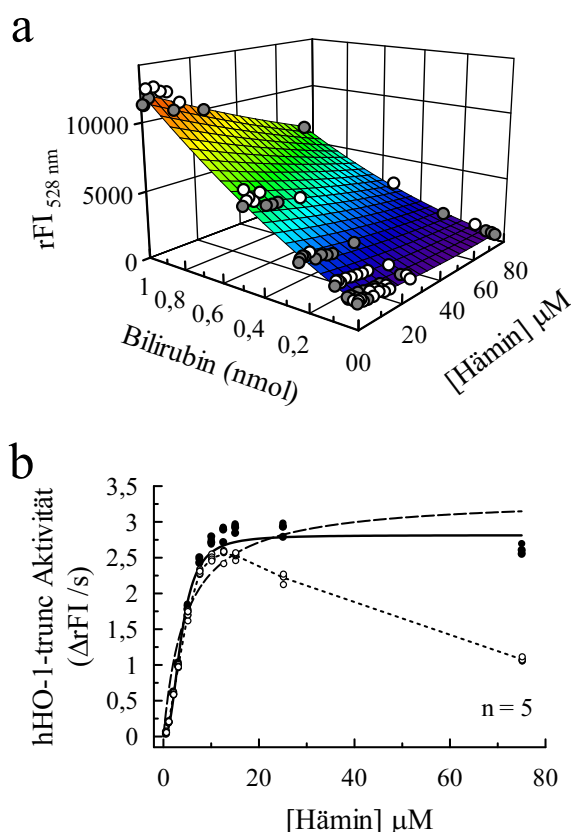
Substrat, rekombinanter BVR und eines NADPH-Regenerierungssystems zeigte einen zeitlichen Anstieg der Fluoreszenzspektren von 500–600 nm (Abb. 3.6a). Die  $\Delta rFI$  bei 528 nm wies nach 15 Minuten Inkubation im Fluoreszenzmessgerät bei 37 °C in allen Ansätzen einen linearen Anstieg auf, der mindestens für eine Stunde konstant blieb (Abb. 3.6b). Interessanterweise haben die extrapolierten Geraden der linearen Regressionen (jeweils mindestens  $R^2 \geq 0,98$ ) einen gemeinsamen Ursprung, der auf die gleiche Anfangsmenge von BR in den Reaktionen hinweist. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Bildungsrate von BR, bzw. die HO-1 Aktivität, direkt proportional zur eingesetzten Menge an Gesamtprotein vom, hHO-1-trunc enthaltenden, periplasmatischen Extrakt ist (Abb. 3.6c).

Weiterhin wurde die rekombinante hHO-1-trunc bezüglich ihrer Aktivität charakterisiert. Dazu wurde mittels der Fluoreszenz-basierten Detektion von BR eine Substrat-abhängige Enzymkinetik mit Hämin als Substrat für die rekombinante hHO-1-trunc durchgeführt, um den  $K_m$ <sup>2</sup> (eine charakteristische Enzym-Konstante) zu bestimmen, welcher mit 3  $\mu$ M bei Wilks et al. [1995] für eine ebenfalls verkürzte humane HO-1 mittels Chloroform-Extraktion und UV/VIS-Spektroskopie ermittelt wurde.

Die Echtzeit-Aktivitätsmessung von hHO-1-trunc wurde für 5 verschiedene Ansätze mit jeweils 11 unterschiedlichen Häm-Konzentrationen von 0,5–75  $\mu$ M gleichzeitig in einer 96-Loch Mikrotiterplatte durchgeführt. Es zeigte sich, dass hohe Konzentrationen von Hämin das Fluoreszenzsignal unterdrücken (Abb. 3.7b). Eine Titration von Hämin und BR konnte bestätigen, dass Hämin direkt auf die Fluoreszenzeigenschaften des BR:BSA Komplexes hemmend wirkt (Abb. 3.7a), und somit die gemessenen Aktivitäten bei hohen Konzentrationen falsch abgebildet werden. Deshalb wurde mittels einer quadratischen nicht-linearen Regression die Abhängigkeit der rFI von verschiedenen Konzentrationen an Hämin und BR berechnet. Diese mathematische Modulation konnte zur Korrektur der Aktivitäten bei verschiedenen Hämin Kon-

---

<sup>2</sup> $K_m$ : Substratkonzentration bei halb-maximaler Aktivität eines Enzyms



**Abb. 3.7: Substrat-abhängige Aktivität von hHO-1-trunc.**

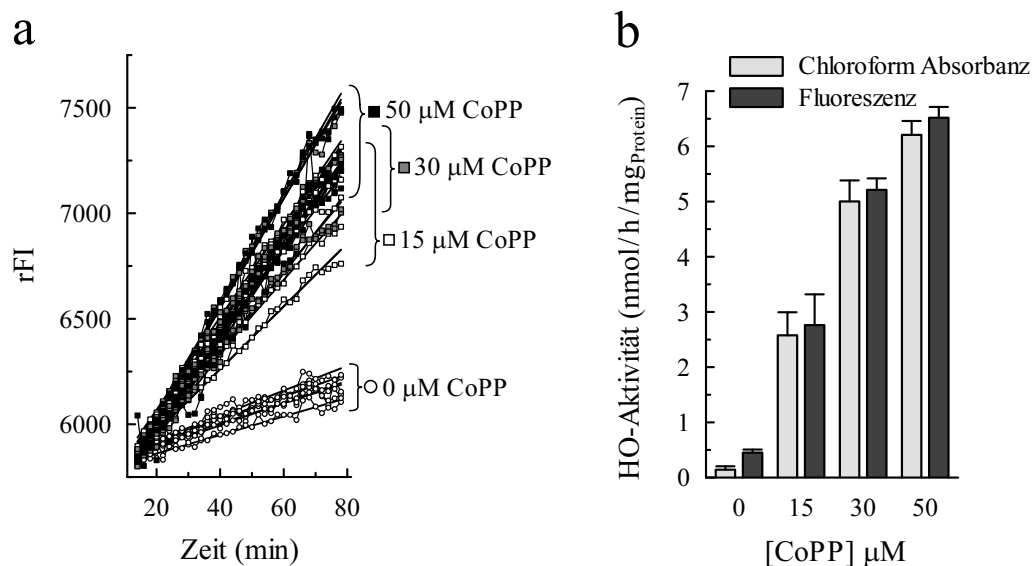
Die enzymatische Aktivität von hHO-1-trunc bei verschiedenen Konzentrationen von Häm. Häm unterdrückt die rel. Fluoreszenzintensität (rFI). (a) Abhängigkeit der rFI von verschiedenen Mengen an BR und Konzentrationen von Häm. Eine durch nicht-lineare quadratische Regression berechnete Fläche beschreibt den Fluoreszenz-vermindernden Effekt von Häm ( $R^2 = 0,99$ ). Gefüllte Kreise liegen unter- und offene oberhalb der Fläche. (b) Substrat abhängige Enzymkinetik von hHO-1-trunc für Häm ( $n = 5$ ). Offene Kreise: unkorrigierte Aktivitäten; schwarze Kreise: mittels quadratischer Regression aus (a) korrigierte Aktivitäten. Die korrigierten Aktivitäten wurden an eine hyperbolische (unterbrochene Linie;  $R^2 = 0,88$ ;  $K_m = 4,6 \mu\text{M}$ ) und eine Hill-Funktion (Linie;  $R^2 = 0,98$ ;  $K_m = 3,8 \mu\text{M}$ ) angeglichen.

zentrationen angewandt werden. Die korrigierten Aktivitäten wurden erstens zur Beschreibung einer Michaelis-Menten-Kinetik an eine hyperbolische Funktion, und zweitens an eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem Hill-Koeffizienten (Hill-Funktion) angeglichen (Abb. 3.7b). Die hyperbolische Angleichung korrelierte nur mit  $R^2 = 0,88$ , wohingegen die Datenpunkte, angeglichen an die Hill-Funktion, mit  $R^2 = 0,99$  korrelierten und ein  $K_m$  von  $3,8 \mu\text{M}$  berechnet wurde, der vergleichbar mit dem publizierten  $K_m$  von  $3 \mu\text{M}$  ist [Wilks et al., 1995].

### HO-Aktivität in Zell- und Organlysaten – Sensitivität und Vergleich zu einer klassischen Methode.

Nachdem die Fluoreszenz-basierte Echtzeit-Detektion von gebildetem BR unter Verwendung von rekombinanter HO-1 etabliert wurde, ergab sich die Fragestellung nach der Funktionalität dieser Strategie zur Messung der HO-Aktivität in Zell- und

Organlysaten. Neben der Detektion von endogener, basaler HO-Aktivität wurde außerdem die Hypothese einer dosis-abhängigen Erhöhung der HO-Aktivität nach chemischer Induktion von HO-1 untersucht. Dazu wurde eine murine Makrophagen Zelllinie (RAW 264.7) für 24 Stunden mit CoPP in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Nach 15 Minuten Inkubation der Reaktionsansätze mit jeweils Lysat aus  $0,5-1 \cdot 10^6$  Zellen wurde in allen Ansätzen ein linearer Anstieg der rFI beobachtet (Abb. 3.8a). Die Normalisierung der zeitlichen Veränderung von rFI auf Gesamt-Proteingehalt und Bilirubin zeigte die erwartete CoPP dosis-abhängige Erhöhung der HO-1 Aktivität (Abb. 3.8b). Diese Ergebnisse konnten mittels einer klassischen Methode, der Absorbanzmessung nach Überführung des gebildeten BR in eine Chloroform-Phase, reproduziert werden (Abb. 3.8b). Für diese Methode musste

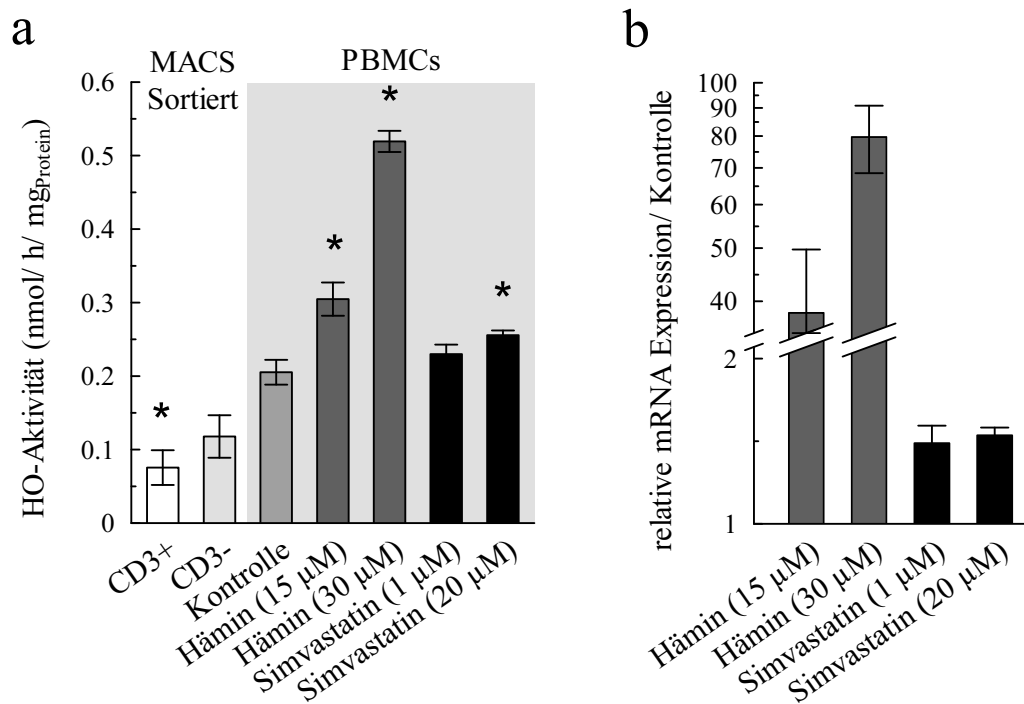


**Abb. 3.8: Fluoreszenz und klassische Methode: HO-Aktivität korreliert in RAW 264.7 nach Stimulation mit CoPP.**

Murine Makrophagen (Zelllinie; RAW 264.7) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von CoPP für 24 Stunden stimuliert. Die Aktivität von HO wurde mittels der Fluoreszenz-basierten Detektion von BR in Lysaten der Zellen gemessen und mit der klassischen Chloroform-Absorbanz Methode verglichen. **(a)** Zeitliche Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität (rFI) aller Einzelreaktionen. **(b)** Die auf Gesamt-Protein normalisierten und BR quantifizierten HO-Aktivitäten der Reaktionen aus (a) sind CoPP konzentrationsabhängig ( $n=6$ ) und korrelieren mit den durch Absorbanz bestimmten Aktivitäten ( $n=4$ ). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

allerdings jeweils ca. 20 mal mehr Material eingesetzt werden, um detektierbare Absorbanzänderungen zu erhalten, was eine wesentlich höhere Sensitivität der Fluoreszenz-basierten Methode indiziert.

Weiterhin wurde die Sensitivität der Fluoreszenz-basierten HO-Aktivitätsmessung in PBMCs untersucht, welche nur eine geringe HO-Aktivität von  $0,21 \pm 0,017 \text{ nmol/h} \cdot \text{mg}$  aufwiesen (Abb. 3.9a). Interessanterweise konnte sogar in der angereicherten Fraktion der  $\text{CD3}^+$  T-Zellen die HO-Aktivität gemessen werden, obwohl die Basalexpression von HO-1 in diesen Zellen sehr gering ist [Pae et al., 2003]. Im Vergleich zu der Fraktion der  $\text{CD3}^-$ -Zellen war diese ca. 40 % geringer ( $0,075 \pm 0,024$  versus  $0,124 \pm 0,028 \text{ nmol/h} \cdot \text{mg}$ ) (Abb. 3.9a). Sogar nach Induktion von HO-1 mit dem sehr schwachen Induktor



**Abb. 3.9: Basale HO-Aktivität in  $\text{CD3}^+$ / $\text{CD3}^-$  Zellen und schwache Induktion von HO-1 Aktivität in PBMCs.**

Die  $\text{CD3}^+$  und  $\text{CD3}^-$  Fraktionen von humanen PBMCs wurden magnetisch angereichert. Gesamt PBMCs wurden mit Hämin oder Simvastatin stimuliert und nach 3 Stunden lysiert. **(a)** Fluoreszenz-basiert gemessene HO-Aktivität in  $\text{CD3}^+$ - und  $\text{CD3}^-$ -Zellen und gesamt PBMCs ohne und nach Stimulation. \* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test, zur PBMC Kontrolle getestet. **(b)** mRNA-Expression von *hHo-1* in humanen PBMCs mit und ohne Stimuli, normalisiert zu *hHprt1* und relativ zur Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, ( $n = 4$ ).

Simvastatin, war in den gesamt PBMCs eine geringe, aber signifikante, Erhöhung der HO-Aktivität detektierbar. Eine Stimulation mit Hämin, welches ein schwächerer Induktor als CoPP ist, führte ebenfalls dosisabhängig zu einer gesteigerten HO-Aktivität, die mit der Fluoreszenz-basierten Methode zur HO-Aktivitätsbestimmung messbar war (Abb. 3.9a).

Die Fluoreszenz-basierte HO-Aktivitätsmessung ist außerdem nicht auf spezielle Zellen oder Gewebe limitiert. Bei der Verwendung von Organen und primären Hepatozyten war jeweils schon eine geringe Menge an unaufgereinigtem Lysat (10–50  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) hinreichend, um einen linearen Anstieg des Fluoreszenzsignals zu detektieren. In Tabelle 3.1 sind die für verschiedene Gewebe gemessenen, auf Gesamtprotein normalisierten, HO-Aktivitäten in  $\text{nmol}/\text{h} \cdot \text{mg}$  dargestellt.

**Tab. 3.1: HO-Aktivitäten in Lysaten verschiedener Organe und primärer Hepatozyten aus C57Bl/6 Mäusen.**

Organ-, bzw. Zelllysate	HO-Aktivität $\pm$ s.d. $\text{nmol}/\text{h} \cdot \text{mg}$
Lunge (n = 4)	$1.94 \pm 0.22$
Niere (n = 4)	$7.05 \pm 0.24$
Herz (n = 4)	$1.52 \pm 0.09$
Milz (n = 4)	$1.44 \pm 0.01$
Primäre Hepatozyten (n = 6)	$79.04 \pm 11.08$
Primäre Hepatozyten, 24 h CoPP (30 $\mu\text{M}$ ) (n = 6)	$199.48 \pm 15.54$

## 3.2 Teil II der Ergebnisse

### Hämoxygenase-1 und die circadiane Uhr

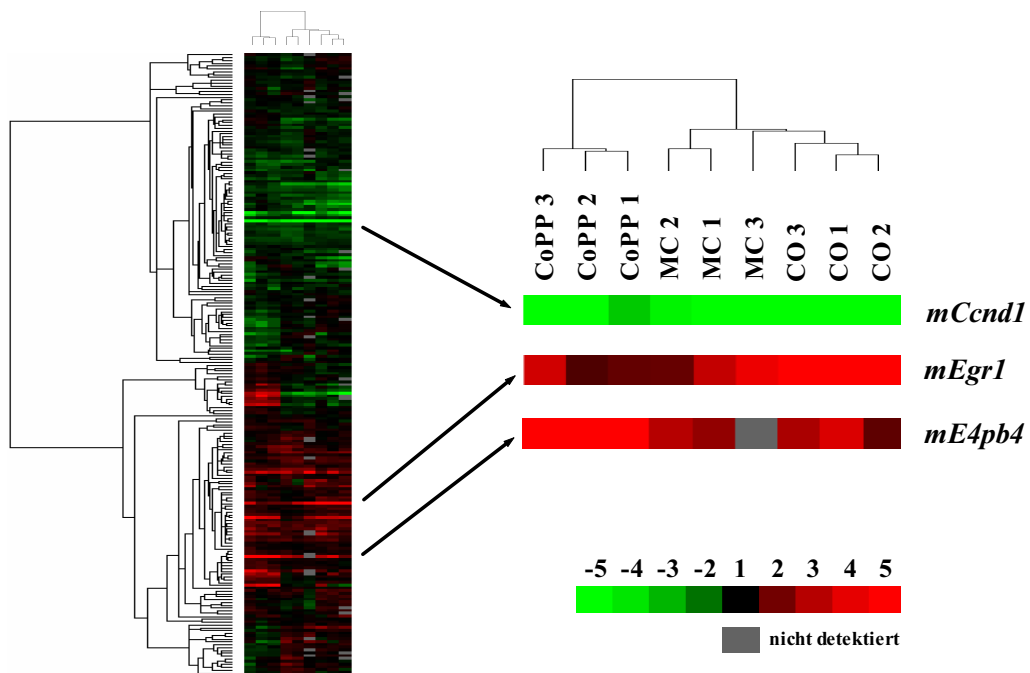
Seit einigen Jahren wird Hämoxygenase-1 mit zellschützenden Eigenschaften gegen oxidativen Stress, Inflammation und Apoptose in Verbindung gebracht. Die dafür verantwortlichen intrazellulären Mechanismen sind allerdings bis heute nicht ganz verstanden. Als Mediatoren für diese Effekte werden die Metabolite von HO-1, insbesondere das Gas CO, diskutiert. Vor einiger Zeit nur als Abfallprodukt des Stoffwechsels betrachtet, nimmt CO heute einen Stellenwert als Signalmolekül ein. Allerdings sind die Zielorte und die daraus resultierenden genregulatorischen Eigenschaften von CO unzureichend bekannt.

Zur Identifizierung von Genen, die durch CO in ihrer Expression beeinflusst werden, wurde durch eine Genexpressionanalyse mittels einer cDNA Micro-Array Technologie nach potentiellen Zielgenen gesucht (3.2.1). Weiterhin wurden die identifizierten Gene in einen Zusammenhang gebracht, woraus sich neue Fragestellungen ergaben, dessen Untersuchungen in den weiteren Abschnitten 3.2.2–3.2.4 beschrieben werden.

#### 3.2.1 Genexpressionanalyse zur Identifizierung der genregulatorischen Signalwirkung von CO

Zur Untersuchung der Signalwirkung von CO auf die Transkription von Genen wurde das Modell der murinen Leber gewählt. Die Leber als stoffwechselreiches Organ ist ein Ort der Degradation von Erythrozyten und besitzt somit einen ausgeprägten Häm-Metabolismus. In der Leber existiert eine hohe Basalexpression von HO-1, die in den Zellfraktionen der Hepatozyten, Kupffer- und sinusidalen Endothelzellen noch stärker induziert werden kann.

Um Gene zu identifizieren, die durch exogenes, oder endogenes (von HO-1 gebildetes) CO in ihrer Genexpression verändert werden, wurde eine Genexpressionanalyse mittels PIQOR<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Männliche C57Bl/6 Mäuse wurden



**Abb. 3.10: cDNA Microarray Analyse deckt drei Gene auf, die durch CO reguliert werden.**

C57Bl/6 ♂ Mäuse wurden für 6 Stunden mit CoPP (5 mg/kg/ip), MC (0,5 g/kg, oral) und CO (500 ppm, Atemluft)(je n = 3) behandelt. Die RNA der Lebern wurde jeweils zusammen mit der vereinten RNA aus Lebern 12 unbehandelten Tiere (Kontrolle) für PIQOR™ cDNA-Arrays eingesetzt. Die zu 80 % in allen Experimenten detektierten Gene (220 von 819) wurden einer hierarchischen Ballungsanalyse unterzogen und graphisch dargestellt. Rote Felder zeigen eine Überexpression und grüne Felder eine Reprimierung des jeweiligen Gens zur Kontrolle an.

Die Statistik der Genexpression aller Experimente zeigt eine signifikante Abgrenzung der mit CoPP behandelten Gruppe zu denen mit CO und MC Behandlung. CoPP verursacht bei vielen Genen eine Regulation, aber nur die drei Gene *mCcn1*, *mEgr1* und *mE4pb4* wiesen bei allen Tieren eine mindestens zweifache gleich gerichtete Genexpression auf. Die gleich gerichtete Expression dieser Gene bedeutet eine gleiche Wirkungsweise von sowohl exogenem CO, als auch endogenem CO, welches durch die, von CoPP induzierte, HO-1 gebildet wird.

mit CO (500 ppm, Inhalation), Methylenchlorid (MC, 0,5 g/kg, oral), welches im Organismus zu CO metabolisiert wird, und CoPP (5 mg/kg, ip) für 6 Stunden, mit je 3 Tieren pro Gruppe, behandelt. Die Genexpression von insgesamt 819 Inflammation und Apoptose assoziierten Genen wurde jeweils in dem gesamt Leberlysate der Tiere untersucht. Als Kontrollgruppe wurden die Leberlysate von 12 unbehandelten Tieren eingesetzt.



Von den 819 untersuchten Genen wurden 220 zu 80 % in allen Experimenten detektiert. Die Expression dieser Gene wurde durch eine hierarchische Ballungsanalyse statistisch ausgewertet und graphisch in Abbildung 3.10 dargestellt. Dabei konnte eine Ballung der Einzelexperimente bezüglich der jeweiligen Behandlung festgestellt werden. Obwohl sich die Behandlung mit CoPP dabei signifikant von den anderen Behandlungen abgrenzte, sollten in diesem Experiment Gene detektiert werden, die in allen Gruppen eine gleichgerichtete, differentielle Expression aufweisen. Dadurch sollten ausschließlich CO-vermittelte Effekte identifiziert werden.

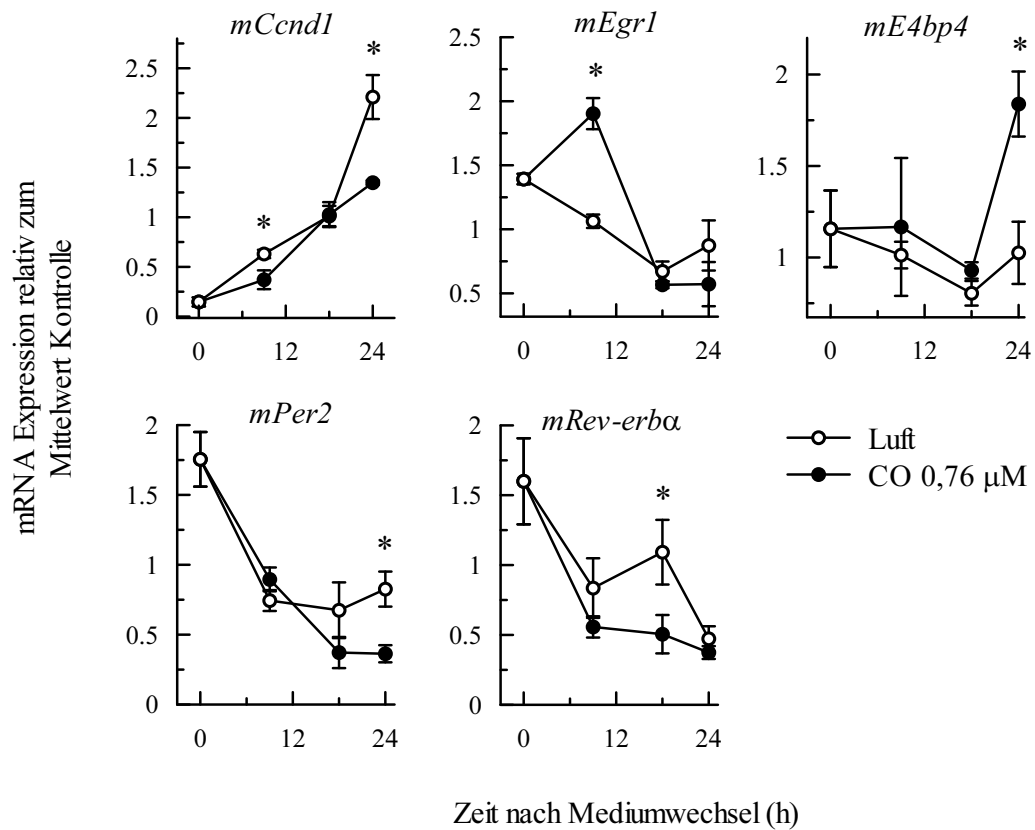
Die drei Gene *mCcmd1*, *mEgr1* und *mE4bp4* zeigten für alle Experimente eine gleichgerichtete und mindestens zweifach differentielle Genexpression. Die Expression von *mCcmd1* war sowohl in der Gruppe der exogenen CO-Behandlung, als auch in den mit CoPP und MC behandelten Gruppen drei- bis achtfach reprimiert. Die Expression der Gene *mEgr1* und *mE4bp4* zeigten in allen Gruppen eine zwei- bis sechsfache Induktion (*mE4bp4* in einem Experiment nicht detektiert). Die Daten der PIQOR™ Genexpressionanalyse konnten mittels real-time qPCR, mit *mHprt1* als Gen für die Normalisierung, verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Hier wurde für die Genexpression des nicht detektierten Wertes für *mE4bp4* eine vierfache Induktion gemessen.

Es wurde versucht die drei Gene in einen Zusammenhang zu bringen, um dadurch einen Ansatz für weitere Untersuchungen in Bezug auf die Signalwirkung von CO zu finden. Die Gene *mE4bp4* und *mEgr-1* kodieren für Transkriptionsfaktoren [Fahmy et al., 2003; Ikushima et al., 1997; Cowell et al., 1992] und CYCLIND1, das Produkt von *mCcmd1* ist eine regulatorische Untereinheit eines Holoenzym, welches in der Regulation des Zellzyklus durch eine Kinaseaktivität den Übergang von der G1- in die S-Phase einleiten kann [Fu et al., 2004]. Eine Gemeinsamkeit dieser drei Gene ist, dass sie eine circadiane Genexpression aufweisen, die jeweils direkt von positiven Elementen der circadianen Uhr kontrolliert wird [Yan et al., 2008; Hunt und Sassone-Corsi, 2007; Panda et al., 2002]. Dies deutete auf einen eventuellen Zusammenhang mit dem Kernoszillator der circadianen Uhr hin. Kürzlich wurde

gezeigt, dass der bZIP-Transkriptionfaktor E4BP4 an D-Boxen eine Funktion als Repressor besitzt und die *mPer2*-Expression inhibiert [Ohno et al., 2007]. Damit stellt E4BP4 ein negatives Element der circadianen Uhr dar, und gab einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang mit dem circadianen Oszillator. Da die molekularen Oszillatoren der circadianen Uhr und des Zellzyklus miteinander vernetzt sind und viele regulative Elemente teilen [Hunt und Sassone-Corsi, 2007], bestärkte somit ebenfalls die Identifikation des Gens *mCcn1* die Hypothese, dass CO einen Einfluss auf den molekularen Oszillator der circadianen Uhr hat.

### 3.2.2 Einfluss von CO auf die Genexpression in primären Hepatozyten

Nach der *in vivo* Genexpressionsanalyse wurden weitere Untersuchungen der regulativen Eigenschaften von CO in einem *in vitro* Lebermodell durchgeführt. Primäre Hepatozyten eignen sich häufig als Lebermodell für *in vitro* Experimente. Daher wurde untersucht, ob primäre Hepatozyten geeignete Zellen für diese Fragestellung sind und hier ebenfalls eine Behandlung mit CO zu einer Veränderung der Genexpression der gefundenen Kandidatengene führt. Dazu wurden primäre Hepatozyten aus männlichen C57Bl/6 Mäusen isoliert (siehe 3.1.2) und unter Verwendung der Begasungsanlage (s. 3.1.3) mit CO behandelt. In Vorexperimenten konnten nach 6 Stunden Begasung (Zeitpunkt von 6 Stunden in Anlehnung an die Micro-Array Genexpressionsanalyse) mit zwei verschiedenen Partialdrücken von CO (0,047 % und 0,091 %) keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Da die Expression der Gene *mCcn1*, *mEgr1* und *mE4bp4* jeweils durch die circadiane Uhr kontrolliert wird, und eventuelle Unterschiede zwischen dem *in vivo*- und *in vitro*-Modell, bezüglich der zeitlichen Wirkungsweise einer Behandlung, möglich sein könnten, wurde die circadiane Genexpression nach CO-Behandlung innerhalb von 24 Stunden zu 4 Zeitpunkten gemessen (Abb. 3.11). Hier zeigte sich, dass die Genexpression von *mCcn1*, *mEgr1* und *mE4bp4* nach einer CO-Behandlung (0,091 %, bzw. 076  $\mu$ M im



**Abb. 3.11: Einfluss von CO auf die circadiane Genexpression in primären Hepatozyten.**

Relative Genexpression in primären C57Bl/6 Hepatozyten nach 0, 9, 18 und 24 Stunden ohne und mit 0,091 % (bzw. 0,76 µM im Medium) CO Behandlung. *mCcn1*, *mEgr1* und *mE4bp4* wiesen zu einigen Zeitpunkten eine differentielle Expression auf, die der PIQOR™ Genexpressionanalyse entspricht. Die CO-Behandlung hatte ebenfalls einen Einfluss auf die circadiane Genexpression der essentiellen Uhr gene *mPer2* und *mRev-erba*. Darstellung der arithmetischen Mittel mit Standardabweichung, \* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test (n = 4).

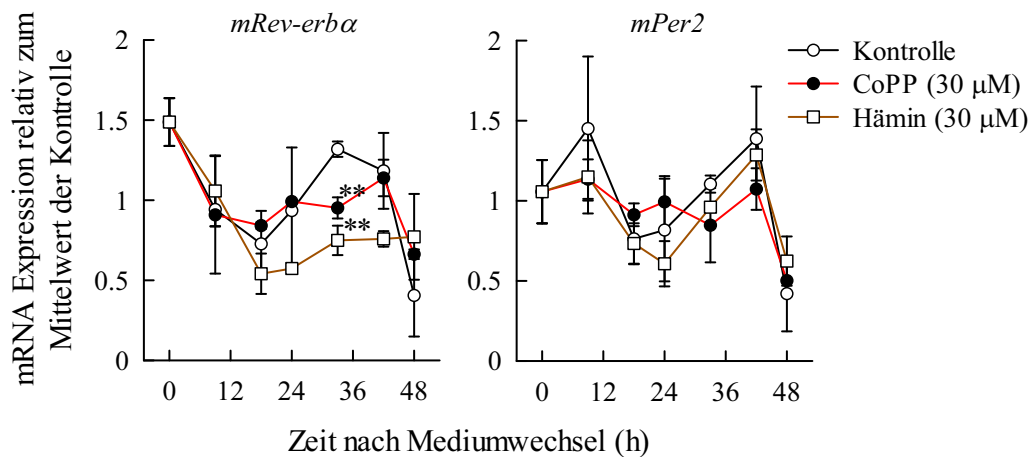
Medium) zu bestimmten Zeitpunkten deutliche Unterschiede aufwies. *mCcn1* war nach 9 und 24 Stunden CO-Behandlung geringer exprimiert und *Egr1* nach 9 Stunden ca. zweifach induziert. *mE4bp4* zeigte nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der Genexpression. Somit konnte in primären Hepatozyten eine, zum *in vivo* Micro-Array Experiment vergleichbare, Regulation der Gene *mCcn1*, *mEgr1* und *mE4bp4* unter Einfluss von CO bestätigt werden.

### CO beeinflusst die Genexpression von essentiellen Uhrgenen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass CO einen regulativen Einfluss auf Gene hat, die unter der Expressionskontrolle des circadianen Uhrwerks stehen und sogar im Fall von E4BP4 eine Komponente der circadianen Uhr darstellen. Bezüglich des von Schibler und Naef [2005] postulierten Zusammenhangs der circadianen Uhr mit dem Häm-Metabolismus (siehe Kapitel 1.2.1) führte dies zu der Hypothese, dass CO einen direkten oder indirekten Einfluss auf den molekularen Oszillator der circadianen Uhr hat. Demnach könnte CO eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität des Transkriptionfaktor-Komplexes CLOCK:BMAL1, bzw. NPAS2:BMAL1 haben und würde zu einer verminderten Expression von Genen führen, die unter der Kontrolle dieses Komplexes stehen. Daher wurde in den CO-behandelten primären Hepatozyten die relative Expression der essentiellen Uhrgene *mPer2* und *mRev-erb $\alpha$*  gemessen (Abb. 3.11). Es konnte dabei jeweils für *mPer2* nach 24 Stunden und für *mRev-erb $\alpha$*  zum Zeitpunkt 18 Stunden ein signifikanter Unterschied in der Genexpression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass CO die regulative Eigenschaft besitzt, den molekularen Hauptmechanismus der circadianen Uhr in primären Hepatozyten zu beeinflussen.

#### 3.2.3 Induktion von HO-1 in primären Hepatozyten

Die sich anschließende Frage war, ob der Effekt des Einflusses auf die Genexpression von Uhrgenen auch mit der Aktivität von HO-1 assoziiert ist. Daher wurde als nächstes untersucht, welchen Einfluss eine Induktion von *mHO-1*, und eine damit verbundene erhöhte CO Produktion, auf die circadiane Genexpression der essentiellen Uhrgene *mPer2* und *mRev-erb $\alpha$*  hat. Dazu wurden primäre Hepatozyten aus C57Bl/6 Mäusen mit zwei verschiedenen Induktoren von HO-1, CoPP (30  $\mu$ M) und Hämin (30  $\mu$ M), stimuliert. Über die folgenden 48 Stunden wurde zu 9 Zeitpunkten die relative Genexpression von *mPer2* und *mRev-erb $\alpha$*  gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mRNA der Gene in den Kontrollzellen der primären Hepatozyten



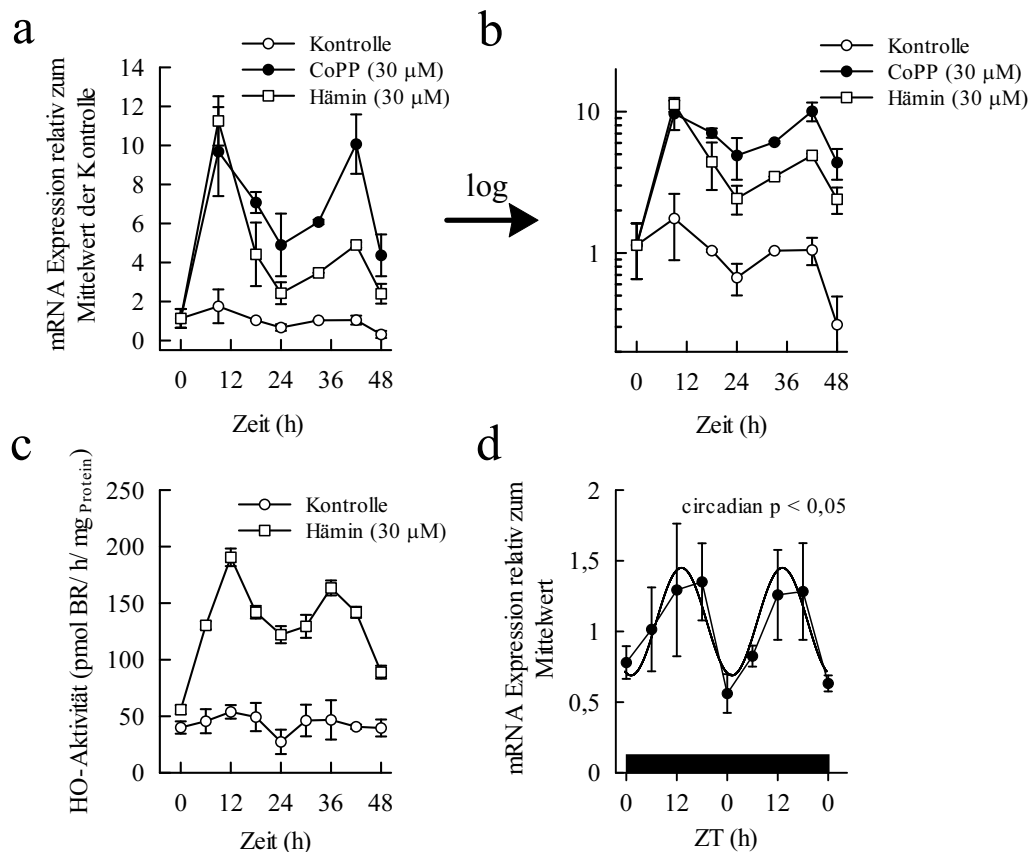
**Abb. 3.12: Einfluss der Induktion von HO-1 auf essentielle Uhrgene in primären Hepatozyten.**

Relative Genexpression von *mRev-erbα* und *mPer2* in primären C57Bl/6 Hepatozyten nach Induktion von HO-1. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit CoPP oder Hämin (je 30 μM) stimuliert. Darstellung der arithmetischen Mittel mit Standardabweichung, \*\* $p < 0,01$ , Mann-Whitney-Test ( $n = 4$ ).

circadian oszilliert (Abb. 3.12). Allerdings wiesen die Oszillationen eine sehr kleine Amplitude von jeweils ca. 1,5-fach auf, weshalb es nicht möglich war zwischen der Kontrolle und den verschiedenen Stimuli zur HO-1 Induktion Unterschiede nachzuweisen. Nur zu einem Zeitpunkt, nach 33 Stunden, wurde für die Genexpression von *mRev-erbα* ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) detektiert. Aussagen über eventuelle Veränderungen bezüglich der Periodenlänge waren wegen der geringen Auflösung der Messung nicht möglich. Somit konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Induktion von HO-1 einen Einfluss auf die circadiane Uhr in primären Hepatozyten hat.

### ***Ho-1* ist in der Leber circadian reguliert**

Weiterhin wurde überprüft, ob und wie stark in dem vorangegangenen Experiment die Stimulation von primären Hepatozyten mit CoPP oder Hämin zu einer Induktion der Genexpression von *mHo-1* geführt hat. Dabei stellte sich überraschenderweise heraus, dass die mRNA von *mHo-1* sowohl in den Kontrollzellen als auch nach Stimulation mit CoPP oder Hämin in einer circadianen Rhythmik exprimiert wurde (Abb. 3.13a).



**Abb. 3.13: HO-1 hat in der murinen Leber und primären Hepatozyten eine circadiane Rhythmik.**

(a) Die relative Genexpression von *mHo-1* in primären C57Bl/6 Hepatozyten weist in Kontrollzellen und nach Induktion von HO-1 mit CoPP oder Hämin (je 30  $\mu$ M) eine circadiane Oszillation auf (circadian,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ). (b) Halblogarithmische Darstellung der Daten aus (a). Die ca. 2-fache Amplitude der Oszillation ist unabhängig vom *mHo-1*-Expressionslevel. Ausschließlich die Magnitude wird beeinflusst. (c) Circadian oszillierende HO-1 Aktivität in primären C57Bl/6 Hepatozyten ohne und nach Stimulation mit Hämin (30  $\mu$ M) (circadian,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ). (d) Circadiane Genexpression von *mHo-1* in der murinen Leber. Nach circadianer Sinusfunktion angeglichen (linie; CircWave, circadian,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ). Darstellung der arithmetischen Mittel mit Standardabweichung.

Die Oszillation der Genexpression wies eine 2-fache Amplitude auf, die nicht durch den jeweiligen Stimulus beeinflusst wurde, wie eine halblogarithmische Darstellung veranschaulicht (Abb. 3.13b).

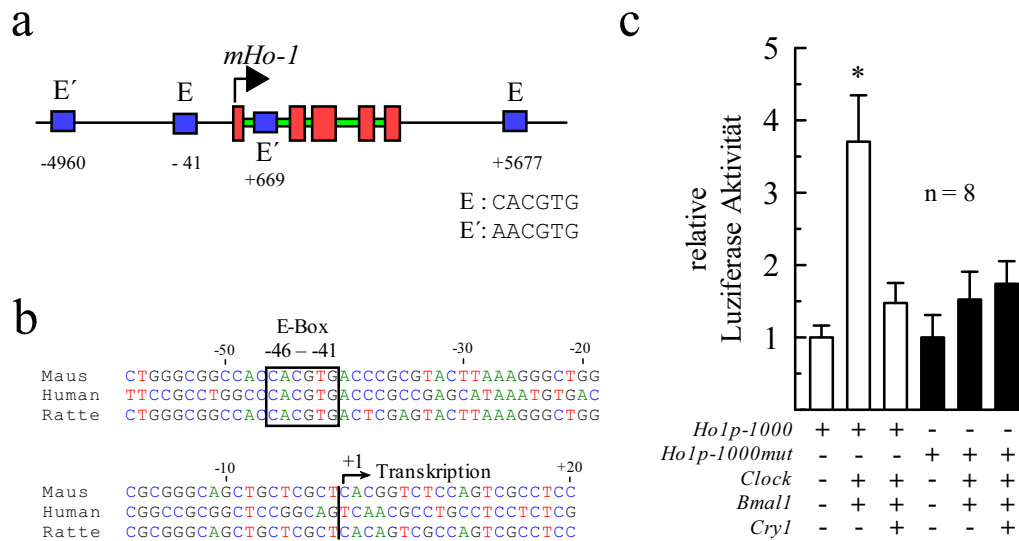
Da die mRNA Expression allein keine Aussage über die Proteinmenge, oder sogar die Aktivität der Produktion von CO zulässt, wurde in primären Hepatozyten untersucht, inwiefern die HO-1 Aktivität durch den Induktor Hämin induziert wird und ob sie

ebenfalls eine circadiane Regulation aufweist. Dazu wurden primäre Hepatozyten aus C57Bl/6-Mäusen über 48 Stunden mit  $30\text{ }\mu\text{M}$  Hämin stimuliert. Die Aktivität wurde mittels der, in dieser Arbeit etablierten, Fluoreszenz-basierten Methode (siehe Kapitel 3.1.4) im Abstand von 6 Stunden detektiert. Es zeigte sich, dass die HO-1 Aktivität ebenfalls mit einer 1,5–2-fachen Amplitude, sowohl in den unstimulierten Zellen, als auch nach Induktion der HO-1 mit Hämin circadian oszilliert (Abb. 3.13c). Die Behandlung mit  $30\text{ }\mu\text{M}$  Hämin führte hier zu einer ca. 4-fachen Erhöhung der Magnitude, was auch der Induktion auf mRNA-Ebene entspricht (vergl. Abb. 3.13a). Ebenfalls war die Phase der Oszillation der Aktivität von HO-1 im Vergleich zur Genexpression vergleichbar.

Falls die circadiane Oszillation von *mHo-1* eine funktionale physiologische Rolle spielen sollte, dürfte dies nicht nur auf die Zellkultur in primären Hepatozyten beschränkt sein, sondern müsste wenigstens *in vivo* nachweisbar sein. Um dies zu untersuchen wurden C57Bl/6-Mäuse für zwei Wochen unter strikten 12 Stunden hell/dunkel-Zyklen gehalten. Somit wurde der endogene Rhythmus der Inneren Uhr der Tiere exakt an den exogenen Zeitgeber (Licht) gekoppelt. Anschließend wurde die mRNA Expression von *mHo-1* über 48 Stunden zu 9 Zeitpunkten in der Leber von je 5 Tieren pro Zeitpunkt relativ quantifiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass die *mHo-1* mRNA ebenfalls *in vivo* in der murinen Leber einer circadianen Oszillation folgt. Die jeweilige Genexpression von *mHo-1* in den einzelnen Tieren war sehr unterschiedlich, was zu einer starken statistischen Verzerrung führte, die durch die großen Standardabweichungen erkennbar ist. Trotzdem wurde hierfür eine signifikante circadiane Oszillation statistisch nachgewiesen (circadian  $p < 0,05$ ). Das Maximum der Oszillation lag bei Zeitgeber Zeit (ZT) 14–16, bzw. das Minimum bei ZT 2–4.

### **Der Promotor von *mHo-1* besitzt eine funktionale E-Box**

Als nächstes wurde untersucht, worin die Ursache für eine circadiane Regulation von *Ho-1* begründet sein könnte. Einen Hinweis darauf gab die ähnliche Phase der circadianen Oszillation von *mHo-1* zu *mPer2*, welches in der murinen Leber



**Abb. 3.14: Eine E-Box im Promotor von *mHo-1* ist funktional.**

(a) Der Bereich des Chromosoms 8 des Genoms der Maus (NC\_000074.4 (77989693..77996656)) beinhaltet das *mHo-1*-Gen und mehrere E-Box-, bzw. E'-Box-Motive (Schematisch, grün = Introns, rot = Exons). (b) Alignment eines Promotorbereiches des *Ho-1*-Gens von Maus, Mensch und Ratte. Eine E-Box bei -41 bp vor Transkriptionsstart ist speziesübergreifend konserviert. (c) Die -1000-Region des *mHo-1* Promotors wurde in einen Luziferase-Reporter kloniert (*Ho1p-1000*) und mit weiteren Konstrukten, zur Überexpression von jeweils Clock, Bmal1 oder Cry1, in HEK 293-Zellen co-transfiziert. Clock+Bmal1-Co-Transfektion steigert die Luziferase-Aktivität (weiße Säulen). Co-Transfektion des Reporters mit mutierter E-Box (*Ho1p-1000mut*) und Clock/Bmal1 zeigte keine signifikanten Unterschiede (schwarze Säulen). Mutagenese von CACGTG zu TTTAGT. \* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test ( $n = 8$ ). Darstellung der arithmetischen Mittel mit Standardabweichung.

ebenfalls ein Maximum bei ca. ZT 14–16 aufweist [Yamamoto et al., 2004]. Die circadiane Regulation der Genexpression von *Per2* in der Maus unterliegt verstärkenden Cis-Elementen, die nah am Transkriptionsstart im Promotor lokalisiert sind (-23 bp, E-Box und -163 bp, E'-Box), die Bindungs- und Aktivierungsstellen für den Transkriptionfaktor-Komplex NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 darstellen (siehe Kapitel 1.2.1).

Daher wurde das *mHo-1*-Gen der Maus bezüglich solcher Elemente untersucht und es konnten mehrere E-Box- und auch E'-Box-Elemente gefunden werden (Abb. 3.14a). Besonders attraktiv erschien eines der Enhancer-Elemente im Promotor, da es ähnlich einer E-Box im *mPer2*-Gen [Yamamoto et al., 2004] in kurzer Entfernung, bei -41 bp



vor dem Transkriptionsstart liegt. Ein Vergleich dieses Promotorbereiches zwischen Maus, Mensch und Ratte zeigte, dass dieses Element speziesübergreifend, exakt an der gleichen Stelle hoch konserviert ist (Abb. 3.14b).

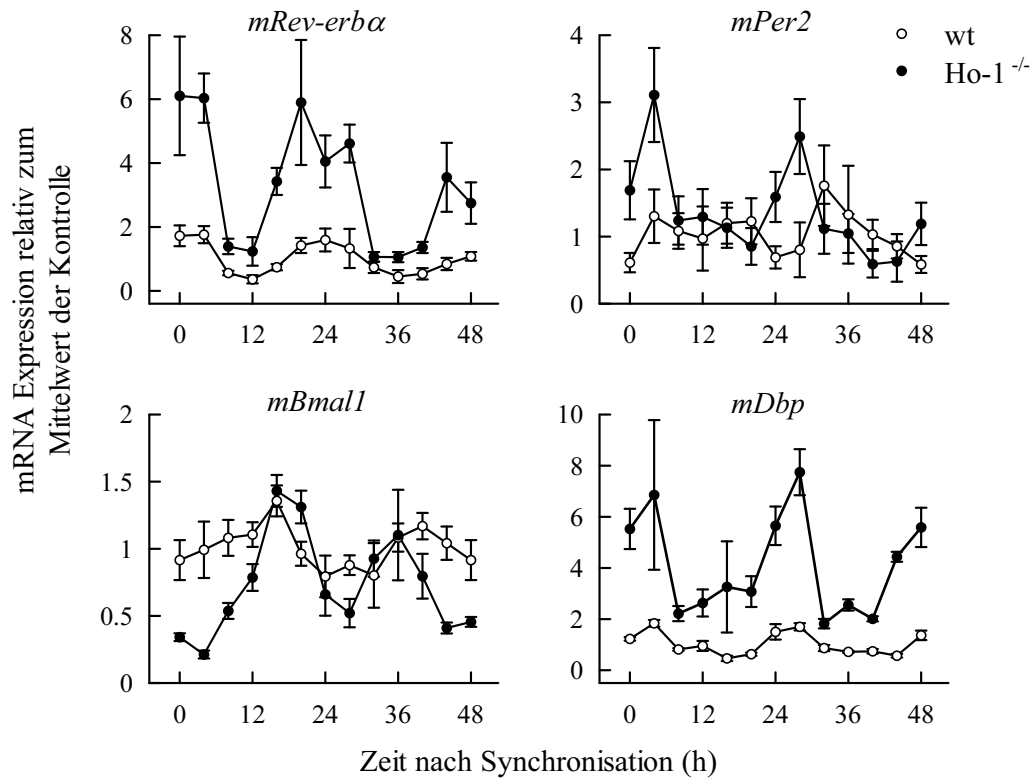
Dies führte zu der Annahme, dass diese E-Box funktional ist und durch Bindung von NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 die circadiane *mHo-1*-Expression gesteuert wird. Um die Funktionalität dieser E-Box zu untersuchen, wurde der Promotor des *mHo-1*-Gens auf sein Potential der Transaktivierung durch CLOCK und BMAL1 untersucht. Dazu wurde die  $-1000$  bp-Region des *mHo-1* Promotors in einen Reporter-Vektor vor ein Luziferase-Gen kloniert. In einem, für diese Methode, standardisierten Zellmodell mit HEK 293 Zellen wurde der Reporter-Vektor in verschiedenen Kombinationen mit weiteren Konstrukten co-transfiziert, die zu einer Überexpression der Proteine CLOCK, BMAL1 und CRY1 führen. Durch Co-Transfektion mit CLOCK und BMAL1 konnte eine 3,5-fache Steigerung der Luziferase-Aktivität gemessen werden, die durch die zusätzliche Expression von CRY1, welches ein Inhibitor für die CLOCK:BMAL1-Aktivität ist, fast auf Normalniveau revertiert wurde (Abb. 3.14c). Damit konnte gezeigt werden, dass der CLOCK:BMAL1-Transaktivierungskomplex in der  $-1000$  bp-Region des murinen *mHo-1* Promotors aktiv ist. Der Beweis, dass speziell die Sequenz der  $-41$  bp E-Box dafür verantwortlich ist, konnte durch die Mutagenese der Sequenz dieser E-Box von CACGTG zu einer funktionslosen Zufallssequenz TTTAGT erbracht werden. Nach Co-Transfektion dieses mutierten Vektors mit den Konstrukten für CLOCK und BMAL1 war keine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität detektierbar (Abb. 3.14c). Diese Ergebnisse zeigen, dass die E-Box ( $-41$  bp) im Promotor von *mHo-1* funktional ist, bezüglich der Transkriptionsaktivierung durch die essentiellen Elemente des molekularen Oszillators CLOCK und BMAL1. Damit könnte eine rhythmische Expression von *mHo-1* erklärt werden.

### 3.2.4 Primäre Fibroblasten aus *Ho-1*-Knockout-Mäusen zeigen eine differentielle Genexpression

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *mHo-1* durch die circadiane Uhr kontrolliert wird, und auch die Aktivität von HO-1 eine circadiane Rhythmik aufweist. Weiterhin hat CO, das Produkt der HO-1-Aktivität, einen Einfluss auf die Oszillation der essentiellen Uhrgene *mPer2* und *mRev-erb $\alpha$* . Dies führte zu der Hypothese, dass HO-1 eine essentielle Rolle für die Funktion des Hauptoszillators der circadianen Uhr spielen könnte.

Es wurde deshalb untersucht, inwieweit HO-1 für die Rhythmusgenerierung des circadianen Uhrwerks essentiell ist. Dazu wurden primäre Fibroblasten aus Ohren von *mHo-1*<sup>-/-</sup>- und *mHo-1*<sup>+/+</sup>-Mäusen (Wildtyp) isoliert und kultiviert. Ein Tag nach Synchronisation der Zellen wurde über 48 Stunden im Abstand von 4 Stunden die relative Genexpression der essentiellen Uhrgene *mRev-erb $\alpha$* , *mPer2*, *mBmal1* gemessen.

Hier zeigte sich, dass die circadianen Oszillation der Uhrgene in *mHo-1*-Knockout-Fibroblasten im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich war (Abb. 3.15). Die Magnitude der Oszillation von *mRev-erb $\alpha$*  war im *mHo-1*-Knockout ca. 3-fach und von *mPer2* ca. 2,5-fach erhöht, wobei sich die Amplitude bei beiden Genen nicht veränderte. Die Phase der Oszillation von *mPer2* war im Knockout um 3–6 Stunden verschoben, wobei kein Einfluss auf die Periodenlänge erkennbar war. Die Genexpressionsdaten von *mRev-erb $\alpha$*  deuten hingegen eine leichte Verkürzung der Periode an. Wesentlich ausgeprägter zeigte sich allerdings eine Verkürzung der Periodenlänge der circadianen Oszillation bei *mBmal1*, wobei hier das zweite Maximum in den *mHo-1*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten schon nach 36 Stunden, etwa 4 Stunden früher als in den Wildtyp-Zellen, zu erkennen war. Im Gegensatz zu *mRev-erb $\alpha$*  und *mPer2*, war die Amplitude der Oszillation von *mBmal1* in den Knockout-Fibroblasten erhöht, wobei die Genexpression von *mBmal1* im Wildtyp nur eine geringe Amplitude von ca. 1,5 und in den *mHo-1*<sup>-/-</sup>-Zellen von 3–4-fach aufwies, und in der Magnitude geringer war.



**Abb. 3.15: Essentielle Uhrgene sind in *mHo-1*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten differentiell exprimiert.**

Relative Genexpression in primären Fibroblasten aus *mHo-1*<sup>-/-</sup> Mäusen und entsprechendem Wildtyp (wt) aus einem Wurf. Die Expression der essentiellen Uhrgene *mRev-erba*, *mPer2*, *mBmal1* und des Gens *mDbp*, welches durch die circadiane Uhr kontrolliert wird, wies jeweils Unterschiede in der Magnitude auf. *mPer2* zeigte für *mHo-1*<sup>-/-</sup> eine Verschiebung der Phase zum Wildtyp. Bei *mRev-erba*, *mBmal1* und *mDbp* deutete sich eine Verkürzung der Periode an. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die circadiane Oszillation der Genexpression von *mDbp*, welches zu den „Output“-Genen der circadianen Uhr gehört, in den *mHo-1*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten, im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen, bei gleicher Amplitude, eine signifikant 2–3-fach höhere Magnitude aufwies (Abb. 3.15). Das bedeutet, dass HO-1 nicht nur für die Genexpression der Hauptelemente der Circadianen Uhr eine Rolle spielt, sondern ebenfalls einen Einfluss auf Uhr-kontrollierte Gene hat.

# Kapitel 4

## Diskussion

In vielen experimentellen Modellen wurden zellschützende Eigenschaften von CO dokumentiert. Entsprechendes gilt für eine Induktion, oder Überexpression von HO-1, die durch den Abbau von Häm endogenes CO produziert. CO hat Eigenschaften eines Signalmoleküls und könnte regulatorische Funktionen von jenen CO-Sensoren modifizieren, die eventuell einen Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene haben.

Zur Aufklärung einer potentiellen genregulatorischen Signalwirkung von CO, in Bezug auf die zellschützende Wirkung, wurde in dieser Arbeit in einem murinen *in vivo*-Lebermodell eine Genexpressionsanalyse für ausgewählte Gene durchgeführt, die mit Inflammation und Apoptose assoziiert sind. Dabei wurden die drei Gene *mCcmd1*, *mEgr1* und *mE4bp4* identifiziert, die sowohl durch exogenes CO (CO-Inhalation), als auch durch endogen metabolisiertes CO (Gabe von MC) und nach chemischer Induktion von HO-1 (CoPP i. p.) in gleicher Weise differentiell exprimiert wurden. Entsprechend der Zielstellung dieser Arbeit, einen Zusammenhang zwischen diesen Genen herzustellen, zeigte sich, dass sie jeweils einer Transkriptionskontrolle der circadianen Uhr unterliegen. Hinzukommend kodiert *E4bp4* für einen Transkriptionsfaktor, der ein essentielles Element für den molekularen Mechanismus der circadianen Uhr darstellt. Daher wurde unter Beachtung eines von Schibler und Naef [2005] postulierten Modells (siehe Abb. 1.3, S. 18), die Hypothese formuliert, dass CO einen

Einfluss auf die Transkription von, primär E-Box regulierten, Uhrgenen *in vivo* hat. Das Modell beschreibt eine hypothetische Interaktion des Häm-Metabolismus mit dem Hauptmechanismus der inneren Uhr, wobei CO einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktor-Komplexes NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 hat. CO könnte dabei an das Häm der PAS-Domäne von NPAS2 oder auch BMAL1 koordinieren und würde die Bindung von NPAS2:BMAL1 an DNA hemmen, was bisher allerdings nur für einen zellfreien *in vitro*-Ansatz beschrieben wurde [Dioum et al., 2002].

Basierend auf dieser Hypothese konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit das bisherige Modell der Interaktion des Häm-Metabolismus mit der circadianen Uhr um die folgenden Aspekte erweitert werden. Es wurde gezeigt, dass

1. CO die circadiane Transkription der essentiellen Uhrgene *mPer2* und *mRev-erba* *in vivo* in primären Hepatozyten beeinflusst,
2. die Transkription von *mHo-1* in murinen, primären Hepatozyten und der Leber eine circadiane Rhythmik aufweist,
3. die Aktivität von mHO-1 ebenfalls circadian ist, dass
4. das murine *mHo-1*-Gen eine funktionale E-Box besitzt, die sehr wahrscheinlich für die circadiane Regulation eine hauptsächliche Ursache ist, und
5. der Funktionsverlust von *mHo-1* eine differentielle circadiane Genexpression von essentiellen Uhrgenen zur Folge hat.

Zusätzlich wurden für die Durchführung der Experimente Methoden etabliert, wie

1. eine neue, fluoreszenz-basierte Methode zur Detektion der HO-Aktivität, die
  - (a) eine hohe Sensitivität aufweist,
  - (b) für unaufgereinigte Zell- und Organlysate geeignet ist, und
  - (c) einen hohen Durchsatz von Proben im Microtiter-Platten Format ermöglicht.

2. eine Anlage zur Begasung von Zellkulturen mit dem Gas CO in geringen Konzentrationen, die
  - (a) keine industriellen Vormischungen der Gase benötigt, und
  - (b) in der eine Begasung von behandelten- und Kontrollzellen parallel, mit dem selben Trägergas, durchgeführt werden kann.

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Punkte diskutiert und anschließend in einem Modell zusammengefasst.

## 4.1 Genexpressionsanalyse im Lebermodell der Maus

Eine *in vivo* Micro-Array-Genexpressionsanalyse sollte dazu dienen, Gene zu identifizieren, die sowohl durch CO, als auch durch eine induzierte HO-1 eine differentielle Genexpression aufweisen. Allerdings liefert eine Genexpressionsanalyse mittels Micro-Array-Technologie neben falsch-positiven Treffern, die jedoch durch weitere Methoden überprüft werden können, den Nachteil von vielen falsch-negativen Ergebnissen. In dieser Arbeit wurden bei der PIQOR<sup>TM</sup>-Genexpressionsanalyse von den 819 zu untersuchenden Genen nur 220 detektiert. Das heißt, eine eventuelle Regulation nicht detektierter Gene, die fast  $\frac{2}{3}$  ausmachten, ist nicht auszuschließen. Unter den detektierten Genen zeigte die Auswertung der Analyse drei Gene, die durch alle Behandlungen in gleicher Weise differentiell exprimiert wurden und in dem funktionalen Zusammenhang stehen, dass sie jeweils durch die circadiane Uhr reguliert werden. Allerdings ist der Hinweis, eines Effekts von CO auf die circadiane Uhr sehr indirekt, da keine weiteren Uhrgene zu der Auswahl der Expressionsanalyse gehörten, die diese Annahme hätten unterstützen können. Jedoch wurde bei Ohno et al. [2007] gezeigt, dass E4BP4, ein wichtiges Element in der Regulation der circadianen Uhr darstellt. Da *mE4bp4* ein identifiziertes Gen der Micro-Array Genexpressionanalyse

war, wurde die Vermutung bestärkt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen CO und der circadianen Uhr besteht.

Die Verwendung von CoPP, welches in diesem Experiment zu Induktion von HO-1 eingesetzt wurde, muss als kritisch betrachtet werden, da CoPP auch HO-1-unabhängige Effekte in der Zelle vermitteln kann, wie bei Mashreghi et al. [2008] gezeigt wurde. Die Statistik der Ballungsanalyse zeigt eine signifikante Abgrenzung der CoPP behandelten Gruppen auf (vgl. Abb. 3.10, S. 56), und deutet somit Eigenschaften von CoPP an, die nicht CO-abhängig und damit eventuell auch nicht HO-1-abhängig sind. Die signifikante Abgrenzung der CoPP behandelten Gruppen ist allerdings nicht zwingend auf eine unspezifische Funktion von CoPP zurückzuführen. Es kann auch ein Hinweis auf die unterschiedliche Wirkung von weiteren Metaboliten des HO-1 katalysierten Häm-Abbaus, wie BV oder BR, sein. Weiterhin könnte auch der zeitliche Aspekt eine Rolle spielen, da die Induktion von HO-1 auf Protein-Ebene zwar sehr schnell ist ( $< 1$  h), aber im Gegensatz zur direkten CO-Behandlung, zu einer Verzögerung der CO-Produktion führt. Das bedeutet, dass die Regulation eines Gens nach CoPP-Behandlung nicht eindeutig einem CO-Effekt zugeordnet werden kann, auch wenn die direkte Behandlung mit CO eine gleichgerichtete und in etwa gleich stark ausgeprägte Regulation zur Folge hatte. Bei einer Genregulation, die bei allen Behandlungen ähnlich war, wurde trotzdem für die CoPP-Gruppe, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit, ein CO-spezifischer Effekt angenommen.

## 4.2 CO-Begasung von primären Hepatozyten

Der Einfluss von CO auf die circadiane Uhr sollte *in vitro* näher untersucht werden, weshalb primäre Hepatozyten für ein Zellkultur-Leber-Modell isoliert wurden. Die sehr aufwändige Isolation von Hepatozyten wurde in dieser Arbeit anhand bestehender Protokolle etabliert und in der Durchführung zeitlich verkürzt, wobei trotzdem sehr gute Ausbeuten von vitalen Hepatozyten erzielt wurden (vgl. 3.1.2, S. 41).

Weiterhin wurde eine Apparatur zur Behandlung der Zellen mit gasförmigem CO

etabliert (Kapitel 3.1.3, S. 42). Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Begasungsanlage wurde nachgewiesen, dass CO ausschließlich in die CO-Kammer eingeleitet wurde (s. 3.1.3, S. 44). Zusätzlich konnte sichergestellt werden, dass sich das CO der Gasphase spätestens nach einer Stunde mit dem Medium im Gleichgewicht befand. Weiterhin wurde durch die Benutzung des selben Trägergases, von baugleichen Kammern und des selben Inkubators gewährleistet, dass sich eine Kultivierung von Zellen in der CO- und Kontroll-Kammer ausschließlich durch das beigemischte CO unterscheidet, und somit Unterschiede in den Zellen nur auf das CO zurückzuführen sind. Zur Einstellung der Partialdrücke der Komponenten des Trägergases und der Beimischung von CO wurden Präzisions-Gasmisch-Kolbenhubpumpen zur dynamischen Herstellung von Kalibriergasen verwendet, die eine sehr exakte Gasmischung aus den verwendeten hochreinen Gasen ermöglichte.

Die Behandlung von primären Hepatozyten mit CO führte zu einer differentiellen Genregulation der Kandidatengene *mCcmd1*, *mEgr1* und *mE4bp4*, die tendenziell mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse vergleichbar war (vgl. 3.2.2, S. 58). Allerdings waren diese Unterschiede nicht nach 6 Stunden, wie im Micro-Array Experiment, detektiert worden. Eine Erklärung dafür könnte eine Phasen-abhängige Antwort auf den Stimulus sein, da es sich um circadian regulierte Gene handelte. Das bedeutet, dass sich der Hauptoszillator der circadianen Uhr in den Zellen der Zellkultur durch Synchronisations-Effekte, wie der Stress der Aufreinigung oder Mediumwechsel, in einer anderen Phase als im *in vivo*-Experiment befunden haben könnte. Dies könnte einen zeitlichen Unterschied der differentiellen Expression der Kandidatengene zwischen *in vitro* und *in vivo* erklären.

Für die Fragestellung eines möglichen Effektes der CO Behandlung auf die circadiane Uhr in primären Hepatozyten konnte eindeutig unter Einfluss von CO eine veränderte circadiane Genexpression für die Gene *mRev-erba* und *mPer2* gezeigt werden. Da diese Uhrgene unter direkter Genexpressionskontrolle des Transkriptionsfaktor-Komplexes CLOCK:BMAL1 stehen, ist dies ein Hinweis, dass CO möglicherweise direkt die DNA-Bindungsaktivität dieses Transkriptionsfaktor-Komplexes hemmt. Ein indirekter



Einfluss von CO, der zu dieser Regulation führt, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

### 4.3 Induktion von HO-1

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern eine Induktion von HO-1 einen Einfluss auf die circadiane Genexpression der Uhrgene hat. Eine chemische Induktion der HO-1 mit Hämin und CoPP in primären Hepatozyten zeigte zwar tendenziell für die arithmetischen Mittel eine Veränderung der jeweiligen Oszillation von *mPer2* und *mRev-erba*, die allerdings größtenteils nicht signifikant war (vgl. Abb. 3.12). Die Amplitude der Oszillationen war sehr gering ( $< 2$ ), was zu großen Standardabweichungen führte. Wie bei einem Vergleich von verschiedenen cDNA-Syntheseprotokollen gezeigt wurde, ist dies mitunter ein methodisches Problem. In dem Vergleich stellte sich zwar heraus, dass die Anwendung des kommerziellen Primer-Mixes QuantiTect<sup>®</sup> die besten reproduzierbaren Ergebnisse lieferte, aber die Varianz mehrerer Messungen trotzdem bis zu 1 C<sub>T</sub> betragen kann. Da in der Real-Time PCR die Veränderung von einem C<sub>T</sub> eine Verdopplung bedeutet, können hier Unterschiede, die kleiner einem Faktor von 2 sind, nur schlecht aufgelöst werden.

In diesem Experiment konnte also nicht eindeutig geklärt werden, ob die Induktion von HO-1 einen Einfluss auf die circadiane Genexpression der essentiellen Uhrgene hat. Allerdings könnte dies eventuell mit einer sensitiveren und zeitlich höher auflösenden Methode näher untersucht werden (s. Ausblick 4.6 S. 81).

#### 4.3.1 Circadiane Regulation von HO-1

In primären Hepatozyten und der murinen Leber zeigte sich eine circadiane Rhythmik der Genexpression von *mHo-1*. Bisher war eine solche Regulation unbekannt, obwohl genomweite Micro-Array-Studien bei Panda et al. [2002], mittels Affymetrix-GeneChip<sup>®</sup> durchgeführt wurden, die circadian regulierten Gene im SCN, der Leber oder Niere der Maus, identifizieren sollten.

Wie erklärt sich die circadiane Regulation von *mHo-1*? Eine Erklärung dafür könnte eine rhythmische Veränderung der Größe des intrazellulären Häm-pools sein. Dafür würde eine circadian regulierte Hämsynthese sprechen, wie sie bei Kaasik und Lee [2004] beschrieben wurde. Gegen diese Annahme spricht allerdings, dass nach Stimulation mit Hämin im Überschuss keine Veränderung der Amplitude der circadianen Oszillation von *mHo-1* erkennbar war; Nach Stimulation mit Hämin oder CoPP änderte sich ausschließlich die Magnitude. Außerdem müsste dann ein Phasenunterschied zwischen der Oszillation von *mAlas1* und *mHo-1* vorliegen, wobei die Phase von *mHo-1* etwas verzögert wäre. Wie jedoch für *mHo-1* gezeigt, und für *Alas1* bei Kaasik und Lee [2004] beschrieben, haben diese Gene in der murinen Leber jeweils ein phasengleiches Maximum bei ZT 14–16. Interessanterweise ist dies ebenfalls die Phase, der circadianen Oszillation von *mPer2* in der murinen Leber [Yamamoto et al., 2004], wobei die Regulation von *mPer2* durch funktionale E-Boxen im Promotor begründet ist. Wie gezeigt werden konnte, besitzt das *mHo-1*-Gen ebenfalls eine E-Box, die in ihrer Lokalisation, mit 41 bp vor dem Transkriptionsstart, der von *mPer2*, bei –23 bp, sehr ähnlich ist. Außerdem ist dieses Cis-Element in den Spezies Maus, Mensch und Ratte hoch konserviert, was auf eine Funktionalität hindeutet (s. Abb. 3.14b, S. 64). Durch ein Transaktivierungs-Experiment, mit der –1000-Region des murinen *mHo-1*-Promotors in einem Luziferase-Reporter, konnte gezeigt werden, dass diese E-Box im Maus-Gen die Aktivität eines CLOCK:BMAL1-Komplexes signifikant um den Faktor 3,5 steigert (s. Abb. 3.14c, S. 64). Dieses Ergebnis ist zwar kein direkter Beweis, dass die Funktionalität der E-Box *in vivo* zu einer circadianen Oszillation führt, macht es aber sehr wahrscheinlich, dass sie einen entscheidenden Anteil daran hat.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die mHO-1-Aktivität in primären Hepatozyten ebenfalls einer circadianen Rhythmik folgt (s. Abb. 3.13, S. 62), also auch die CO Produktion rhythmisch ist. Dies konnte allerdings erst durch die Neuentwicklung einer sensitiven Methode zur Messung der HO-Aktivität untersucht werden.

### **Echtzeit-Messung der HO Aktivität mittels Fluoreszenz von gebildetem Bilirubin**

In den letzten vier Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden zur Messung der HO-Aktivität publiziert. Allerdings sind diese nicht sehr sensitiv, oder erfordern durch viele Arbeitsschritte und komplizierte Technik großen Aufwand.

In dieser Arbeit wurde eine einfach durchzuführende und sensitive, auf Fluoreszenz basierende Methode etabliert, um die Aktivität von HO in Lysaten zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass gebildetes BR während der enzymatischen Degradation von Hämin durch die Messung der relativen Fluoreszenz von BR im Komplex mit BSA in Echt-Zeit detektiert werden kann. Um bei der Katalyse von Hämin über BV zu BR standardisierte Bedingungen zu erhalten wurde eine rekombinante BVR hergestellt, die durch ihre enzymatischen Eigenschaften eine schnelle Umwandlung des Zwischenproduktes BV zu BR gewährleistet und die Geschwindigkeit der zu untersuchenden HO-Aktivität nicht limitiert (Abb. 3.5, S. 47).

Bei Verwendung einer rekombinanten HO-1 konnte gezeigt werden, dass die Steigung der rFI ( $\Delta rFI/s$ ) direkt proportional zur Menge an eingesetztem HO Protein ist (Abb. 3.6c, S. 49), was eine Voraussetzung für eine exakte Methode war. Es zeigte sich, dass die Bildung des BR in jeder Reaktion den gleichen Ursprung hat, da sich die extrapolierten Regressionen ca. 3 Minuten nach Beginn der Inkubation bei 37 °C exakt in einem Punkt treffen (Abb. 3.6b, S. 49).

Obwohl BR auch in einer Echt-Zeit Kinetik mittels UV/VIS-Spektroskopie gemessen werden kann, ist diese Strategie nicht für Reaktionen geeignet, in denen Hämin beteiligt ist. Dies ist, durch die sich überlagernden Absorbanzspektren von BR und Hämin, sehr limitiert, wenn das Spektrum von Hämin abnimmt und sich das von BR erhöht (Abb. 1.2, S. 13). Bei der hier etablierten Methode wurde festgestellt, dass Hämin ebenfalls einen unterdrückenden Einfluss die Fluoreszenz des BR:BSA-Komplexes hat. Allerdings hat dies hier keinen entscheidenden Effekt auf die Sensitivität der Messung oder kann gegebenenfalls korrigiert werden. Für die Detektion der HO-Aktivität in

Homogenaten wurde stets die gleiche Konzentration von Hämin verwendet, die im Bereich von  $V_{max}$  liegt und die hohe Auflösung der rFI-Messung nur geringfügig beeinflusst (Abb. 3.7b, S. 51). Dies gilt ebenfalls für die Abnahme von Hämin während der Reaktion, wie es die konstante Steigung der rFI in der einzelnen Reaktionen zeigt (Abb. 3.6b, S. 49). Selbst wenn es, z. B. für die Bestimmung einer substratabhängigen Enzymkinetik, erforderlich sein sollte, die Konzentration von Hämin zu ändern, kann, wie in Abbildung 3.7, S. 51 gezeigt, der Einfluss von Hämin auf die rFI durch eine mathematische Modulation korrigiert werden. Hier wurde eine rekombinante verkürzte humane HO-1 durch die Bestimmung des  $K_m$  enzymatisch charakterisiert, der mit  $3,8 \mu\text{M}$  vergleichbar zu dem publizierten Wert von  $3 \mu\text{M}$  für ein sehr ähnliches Protein ist [Wilks et al., 1995]. Der Unterschied für diese  $K_m$ -Werte könnte in der Modifikation der hier benutzten hHO-1-trunc, einer zusätzlichen C-terminalen Aminosäuresequenz (Strep-Tag), begründet sein. Die Ergebnisse dieses Experiments und zusätzlich ein direkter Vergleich mit der klassischen Chloroform-Absorbanz-Methode, in dem stimulierte RAW 264.7 Zellen untersucht wurden, stellen einen Nachweis der präzisen Funktionalität der neu entwickelten Methode dar.

Generell verhindert die Autofluoreszenz von Lysaten eine absolute Quantifizierung von BR und außerdem ist die Fluoreszenzmessung eines Lysates mit einer relativ großen Varianz behaftet, die eine geringe Sensitivität der Messung zur Folge hat. Die Echtzeit Detektion einer ansteigenden rFI dagegen ermöglicht eine reproduzierbare Messung von formiertem BR in einer *in vitro* Reaktion. Dabei ist die Autofluoreszenz der Homogenate vernachlässigbar, da hierbei nur die zeitliche Zunahme des Fluoreszenzsignals ( $\Delta\text{rFI}/\text{Zeit}$ ) für die Quantifizierung herangezogen wird. Dadurch wurde eine Auflösung der Messung erreicht, die ca. 20 mal größer ist, als die der Absorbanzmessung mittels UV/VIS-Spektroskopie, was durch den relativ großen dekadischen molaren Absorptionskoeffizienten von  $60 \text{ l}/\text{mM} \cdot \text{cm}$  für BR begründet ist. Die Sensitivität der Echtzeit-Fluoreszenzmessung ist vergleichbar mit der von Gaschromatographie [Cavallin-Stahl et al., 1978; Vreman und Stevenson, 1988] und HPLC [Ryter et al., 2007]. Dadurch war es möglich die basalen Aktivitäten von HO in Organen von

naiven Mäusen, unstimulierten Zellkulturen, und auch von Zellen, die nur eine geringe HO-1 Expression aufweisen, wie angereicherte CD3<sup>+</sup>- und CD3<sup>-</sup>-T-Zellen, zu messen. Ein weiterer großer Vorteil dieser Methode ist eine optionale parallele Messung von bis zu 384 Proben in einem Microtiter-Platten-Fluoreszenzmessgerät. Dazu sind nur geringe Mengen von unaufgereinigtem Zell- oder Organlysats erforderlich, was die Methode sehr einfach gestaltet. Außerdem werden hier Fehlerquellen, entstehend durch Prozeduren der Aufreinigung (Anreicherung der Microsomen, Chloroform-Extraktion) ausgeschlossen.

Zusammengefasst wurde ein Verfahren zur Detektion der HO-Aktivität entwickelt, die eine exakte und sensitive Messung mit einer schnellen und einfachen Prozedur verbindet, was einen Hochdurchsatz von Proben unter standardisierten Bedingungen ermöglicht. Dieses Verfahren eignet sich zur Detektion von HO-Aktivität in Lysaten von Zellen, Organen und ebenfalls zur enzymatischen Charakterisierung von verschiedenen HO-Spezies und Derivaten.

## 4.4 Die circadiane Uhr bei Funktionsverlust von *mHo-1* in Fibroblasten

In den bisherigen Experimenten wurde der Einfluss von CO oder einer induzierten HO-1 auf die circadiane Uhr untersucht. Weiterhin stellte sich die Frage, inwiefern die circadiane Oszillation durch Depletion von *Ho-1* beeinträchtigt ist. Dies wurde in primären *mHo-1*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die circadiane Oszillation der essentiellen Uhrgene *mRev-erbα*, *mPer2* und des Output-Gens *mDbp* in diesen Zellen in der Magnitude erhöht war. Im Gegensatz dazu wies die circadiane Oszillation von *mBmal1* in *mHo-1*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten eine verringerte Magnitude auf, was die beschriebene Repressor-Aktivität von REV-ERBα für die *Bmal1*-Transkription aufzeigt [Schibler und Naef, 2005]. Ausgehend von der Hypothese, dass metabolisiertes CO einen hemmenden Einfluss auf die Transkriptionsfaktor-

Aktivität von NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 hat, spiegeln die Daten den erwarteten Effekt einer erhöhten Magnitude bei E-Box kontrollierten Genen wider, da in den *mHo-1<sup>-/-</sup>*-Zellen kein CO von der HO-1 produziert wird. Im Vergleich dazu war bei der Verstärkung der Funktion von HO-1, im Experiment mit chemischer Induktion durch Häm und CoPP, andeutungsweise eine gegensätzliche Regulation, d. h. eine Erniedrigung der Magnitude, (besonders bei *mRev-erbα*) erkennbar (vgl. Abb. 3.12, S. 61). Weiterhin war für *mPer2* in den *mHo-1<sup>-/-</sup>*-Fibroblasten eine Phasenverschiebung zu erkennen und eine verkürzte Periode deutete sich bei *mRev-erbα* und besonders ausgeprägt bei *mBmal1* an. Allerdings lassen die Daten in dieser zeitlichen Auflösung keine exakte Auswertung dieser Oszillations-Charakteristika zu.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von HO-1 eine Funktion im molekularen Mechanismus der circadianen Uhr besitzt. Es bleibt allerdings ungeklärt, ob dafür die fehlende CO-Produktion verantwortlich ist, oder die Folgen des *mHo-1<sup>-/-</sup>*-Knockout zu unspezifischen Kompensationseffekten in der Zelle führen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass weitere Metabolite des Häm-Abbaus einen Einfluss haben können. Dabei hat insbesondere das Häm, welches im *mHo-1<sup>-/-</sup>* nicht durch die HO-1 abgebaut werden kann, das Potential regulatorische Mechanismen der circadianen Uhr zu beeinflussen. Es bindet erstens an PER2 und kann dessen Stabilität, durch einen beschleunigten proteasomalen Abbau, beeinflussen [Yang et al., 2008]. Zweitens ist es für die DNA-Bindung von NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 erforderlich, und es verstärkt drittens durch Bindung an REV-ERBα dessen Repressoraktivität, was neben der Beeinflussung des Hauptoszillators auch Regulationen für den Output der circadianen Uhr bedeuten könnte [Yin et al., 2007]. Weiterhin zeigt Häm in NIH3T3-Zellen eine ultradiane Rhythmik mit einer Periodenlänge von 8 Stunden [Rogers et al., 2008]. Allein durch die circadianen Oszillationen der Synthese und des Abbaus von Häm lässt sich dies nicht erklären, könnte aber für die regulativen Funktionen von Häm eine Bedeutung haben.

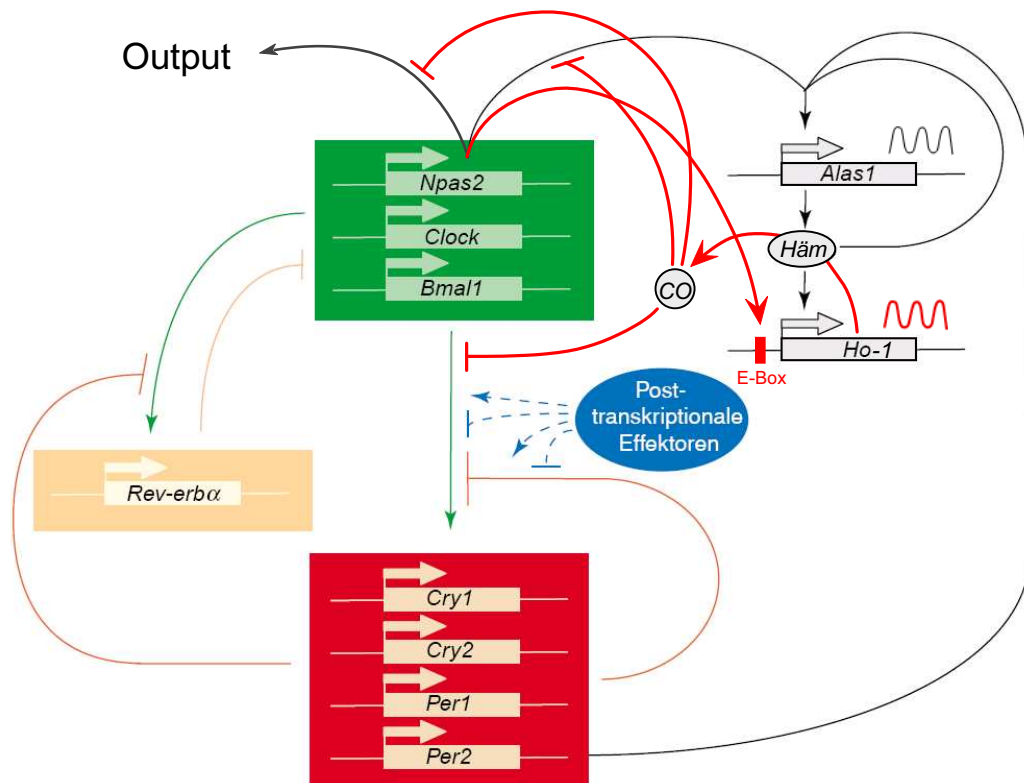
Bezüglich einer Funktion von HO-1 in dem Regelwerk der circadianen Uhr, kann bei diesen Ergebnissen von einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren ausgegangen

werden, wobei sich die jeweiligen Aktivitäten, von z. B. Häm und CO, nicht gegenseitig ausschließen müssen. So könnte CO, durch die Modulation von NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1, einen dämpfenden Einfluss auf die Magnitude ausüben, und das Häm, durch den Einfluss auf die Aktivität von REV-ERB $\alpha$  und die PER2 Degradation, einen Phasen- und Periodeneffekt verursachen.

## 4.5 Erweitertes Modell der Interaktion des Häm-Metabolismus mit der circadianen Uhr

Viele metabolische Prozesse sind im Säugetier periodisch an tageszeitliche Veränderungen angepasst, deren Rhythmik von der circadianen Uhr reguliert wird. Dazu zählt auch der Häm-Metabolismus, der über die Synthese von Häm, durch Regulation von *Alas1*, an den molekularen circadianen Oszillator gekoppelt ist [Kaasik und Lee, 2004]. Dieser Zusammenhang wurde bei Schibler und Naef [2005] in einem Modell zusammengefasst, welches durch die Ergebnisse dieser Arbeit erweitert werden konnte (Abb. 4.1). Es zeigt sich, dass der Häm-Metabolismus noch wesentlich enger mit dem regulativen Netzwerk der circadianen Uhr verknüpft ist, als bisher angenommen war. Es konnte ergänzt werden, dass ebenfalls der Abbau von Häm einer circadianen Kontrolle der positiven Elemente der negativen Rückkopplungsschleife des Hauptoszillators unterliegt. Das Kontrollelement ist dabei eine funktionale E-Box im Promotor von *mHo-1*, die eine Aktivierung der Transkription durch NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 initiieren kann. Daraus resultiert eine HO-1-Aktivität, die zu einer rhythmischen CO-Produktion führt. Da das CO die Aktivität von NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 hemmen kann, stellt dies eine weitere negative Rückkopplung auf den circadianen Hauptoszillator und den Output der circadianen Uhr dar.

Welche physiologische Bedeutung könnte dieser Mechanismus besitzen? Die Beantwortung dieser Frage kann in zwei Fälle unterteilt werden: Einerseits integriert sich der Häm-Metabolismus in das Netzwerk des molekularen Mechanismus der circadianen



**Abb. 4.1: HO-1 als Komponente des circadianen Oszillators im Säugetier.**

Der Metabolismus von Häm ist mit dem circadianen Hauptoszillator gekoppelt. Die negative Rückkopplungsschleife des molekularen Oszillators mit den Komponenten CLOCK, NPAS2, BMAL1 im positiven Arm und PER1, PER2, CRY1, CRY2 im negativen Arm ist in Abb. 1.3 (S. 18) beschrieben. ALAS1 wird über den positiven Arm dieser Rückkopplungsschleife circadian reguliert. Zusätzlich wird die Transkription von *Ho-1* über eine E-Box im Promotor des *Ho-1*-Gens ebenfalls circadian reguliert. Die Produktion von CO, als Folge des Hämabbaus durch die rhythmische Aktivität von HO-1, inhibiert das Transkriptionspotential der NPAS2- bzw. CLOCK-BMAL1 Heterodimere und stellt somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf den circadianen Oszillator dar, und kann den Output der circadianen Uhr beeinflussen. *Modifizierte Abbildung aus Schibler und Naef [2005].*

Uhr. Wie der Phänotyp bei Funktionsverlust von *mHo-1* zeigte, hat dies einen Einfluss auf die Parameter der Magnitude, Phase und Periode dieser Oszillation. Betrachtet man ein essentielles Uhrgen als einen Faktor, der diese Charakteristika beeinflussen kann, muss *mHo-1* als ein solches gelten. Die Integration des Häm-Metabolismus als eine Komponente der circadianen Uhr scheint ein plausibler Prozess in der Evolution zu sein, da das Häm und dessen Stoffwechsel ubiquitär sind, und dies eine



Kommunikation der Inneren Uhr mit dem Metabolismus darstellt.

Andererseits ist HO-1 aber mannigfaltigen Regulationen unterlegen, die weitaus stärkere Veränderungen der Gen-, Proteinexpression und Aktivität verursachen als eine 2-fache Amplitude, wie für die circadiane Oszillation von *mHo-1* in der murinen Leber festgestellt wurde. Wenn die Induzierbarkeit von HO-1, wie z. B. bei Verletzung, Infektion oder oxidativem Zellstress, einen Einfluss auf die Funktion der circadianen Uhr hätte, würden die peripheren Uhren einer sehr variablen Dynamik unterliegen, je nach Aktivitätsstatus der HO-1. Dies konnte mit den bisherigen Experimenten nicht geklärt werden, könnte aber hypothetisch einen funktionalen Mechanismus darstellen, der eine Erklärung für zellschützenden Funktionen von HO-1 sein könnte. Zellulärer Stress der zu einer Induktion von HO-1 führt, könnte somit über den Output der circadianen Uhr Mechanismen modulieren, die mit den beschriebenen protektiven Effekten von HO-1 assoziiert sind.

## 4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu zwei grundlegenden Fragestellungen. Erstens stellt sich die Frage nach einer Bedeutung des Häm-Katabolismus für die Funktion der circadianen Uhr, wobei die Aktivität von HO-1 eine essentielle Funktion bei der Rhythmusgenerierung des Hauptoszillators einnehmen könnte. Zweitens ist ungeklärt, inwieweit ein Einfluss von CO auf den circadianen Oszillator einen Mechanismus darstellt, der für die beschriebenen zellschützenden und antiinflammatorischen Eigenschaften von HO-1 eine Bedeutung haben könnte.

Zur Aufklärung einer potentiellen Funktion von HO-1 für die Funktion der circadianen Uhr, soll zunächst untersucht werden, ob CO tatsächlich zu einer Verminderung der NPAS2:BMAL1-, bzw. CLOCK:BMAL1-Aktivität *in vivo* führt. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass CO einen Einfluss auf die Transkription essentieller Uhrgene hat, die von NPAS2:BMAL1, bzw. CLOCK:BMAL1 aktiviert werden. Es ist allerdings bisher ungeklärt, wo der molekulare Angriffspunkt von CO *in vivo*

ist. Die *in vitro*-Experimente von Dioum et al. [2002] haben nur rein hypothetisch gezeigt, dass CO an das PAS-Domänen gebundene Häm von NPAS2 oder CLOCK koordinieren kann und damit einen Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität hat. Durch Transaktivierungsexperimente mit einer transienten Co-Transfektion eines Luziferase-Reporter-Konstruktes, das 6 E-Box-Elemente enthält (pGL3\_E6S) [Vanselow et al., 2006], mit CLOCK und BMAL1 soll in HEK 293 Zellen untersucht werden, ob CO-Begasung zu einer Steigerung der Aktivität von CLOCK:BMAL1 *in vivo* führt. Außerdem könnte dies auch unter Induktionsbedingungen von HO-1 untersucht werden. Dabei wäre interessant, wie sich dabei die Luziferase-Aktivität verhält, wenn neben Hämin weitere Agenzien zu Induktion von HO-1 verwendet werden, da einerseits Hämin selbst Auswirkungen auf diese Regulation haben kann und andererseits unklar ist, welches Häm bei einer Häm-unabhängigen HO-1-Induktion das Substrat der HO-1 darstellt. Ist also der Häm-pool ausreichend groß, dass auch *in vivo* die CO-Produktion gesteigert ist und welche Auswirkungen hat dann die Reduktion dieses Pools? Dazu müsste allerdings der Faktor Häm kontrolliert werden, wie es z. B. durch die Depletion von Häm mittels Hemmung der Häm-Synthese (Succinyl-Aceton), oder Hämin im Überschuss, erreicht werden kann. Ergänzend zur Messung der Luziferase Aktivität nach Transaktivierung könnte durch Chromatin Immunopräzipitation (ChIP), oder Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) die CLOCK:BMAL1-Bindung an DNA quantifiziert werden.

Weiterhin soll die Dynamik der circadianen Uhr, in Bezug auf CO-Begasung und Überexpression, bzw. spezifische Herunterregulation von *Ho-1* mittels RNA Interferenz (RNAi) unter gleichen Häm-Bedingungen, wie oben genannt, untersucht werden. Unter Verwendung von Zelllinien, die beispielsweise stabil mit einem *Bmal1*-, oder *Per2*-Promotor getriebenen Luziferase-Reporter transfiziert werden, kann die Oszillation der circadianen Uhr in Echtzeit über mehrere Tage aufgenommen und bezüglich der Periode, Amplitude und Magnitude ausgewertet werden [Vanselow et al., 2006]. Eine weitere große Bedeutung von HO-1 für die Innere Uhr im Säugetier könnte eine Auswirkung auf den Aktivitätsrhythmus darstellen. Dazu soll das circadiane

Aktivitätsprofil von *Ho-1*-Knockout-Mäusen untersucht werden. Das Laufradverhalten dieser Mäuse, im sogenannten Freilauf, ohne äußeren Zeitgeber, könnte dann eventuelle Unterschiede der endogenen Periode ihrer Inneren Uhr im Vergleich zum Wildtyp aufzeigen, was klären würde, ob HO-1 tatsächlich ein essentielles Uhrgen darstellt. Im SCN des Hamsters wurde eine gering erhöhte HO-2-Aktivität in der Nacht gemessen [Rubio et al., 2003]. Allerdings konnten hier durch Hemmung der HO-Aktivität mittels Zink-Protoporphyrin IX keine Einflüsse auf die Oszillation im SCN nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass HO-1 eventuell keinen direkten Einfluss auf den Hauptschrittmacher der circadianen Uhr besitzt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es durch eine Rückkopplung der peripheren Oszillatoren auf den SCN zu einer HO-1 vermittelten Veränderung des endogenen Aktivitätsrhythmus kommen kann.

In Bezug auf die zellschützenden Eigenschaften von HO-1, stellt sich einerseits die Frage, ob eine Rückkopplung der HO-1-Aktivität auf den circadianen Oszillator diesen Schutz vermittelt. Ist die circadiane Uhr also an der beschriebenen protektiven Wirkung von HO-1 beteiligt? In einem Hepatozytenmodell, für welches beschrieben wurde, dass eine Induktion von HO-1, bzw. die Behandlung mit CO einen Schutzeffekt aufweist, könnte dies näher untersucht werden. HO-1 schützt z. B. vor einer TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose in primären Hepatozyten [Sass et al., 2003]. Durch Herunterregulation mittels RNAi von *Bmal1* könnte in diesen Zellen die Funktion der circadianen Uhr ausgeschaltet werden, da der Funktionsverlust von BMAL1 zu einer Arrhythmie der Oszillation des Hauptoszillators führt [Okamura, 2007]. Dies würde eine Untersuchung des Zusammenhangs des HO-1 vermittelten Zellschutzes mit der Circadianen Uhr ermöglichen.

CO ist ein Signalmolekül, dessen Angriffspunkte bis heute noch nicht hinreichend bekannt sind. In dieser Arbeit wurde ein möglicher Mechanismus vorgestellt, dessen Relevanz eine physiologische Bedeutung haben könnte. Allerdings wird sich erst in

Zukunft nach den weiteren Untersuchungen herausstellen, inwiefern die Interaktion des Häm-Katabolismus mit der circadianen Uhr ein fein-modulativer Prozess für periphere Uhren ist, oder dies sogar eine Erklärung für die zellprotektiven Eigenschaften einer induzierten HO-1 darstellt.

# Literaturverzeichnis

- Abraham, N. G., Lin, J. H., Schwartzman, M. L., Levere, R. D. und Shibahara, S.: The physiological significance of heme oxygenase. In: *Int J Biochem*, Band 20(6):S. 543–558, 1988.
- Allen, T. A. und Root, W. S.: Partition of carbon monoxide and oxygen between air and whole blood of rats, dogs and men as affected by plasma ph. In: *J Appl Physiol*, Band 10(2):S. 186–190, 1957.
- Applegate, L. A., Luscher, P. und Tyrrell, R. M.: Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. In: *Cancer Res*, Band 51(3):S. 974–978, 1991.
- Athar, H., Ahmad, N., Tayyab, S. und Qasim, M. A.: Use of fluorescence enhancement technique to study bilirubin-albumin interaction. In: *Int J Biol Macromol*, Band 25(4):S. 353–358, 1999.
- Backer, Ole De, Elinck, Ellen, Blanckaert, Bart, Leybaert, Luc, Motterlini, Roberto und Lefebvre, Romain A: Water-soluble co-releasing molecules (co-rms) reduce the development of postoperative ileus via modulation of mapk/ho-1 signaling and reduction of oxidative stress. In: *Gut*, 2008.
- Balsalobre, A., Damiola, F. und Schibler, U.: A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. In: *Cell*, Band 93(6):S. 929–937, 1998.
- Beaven, G. H., Chen, S. H., d' Albis, A. und Gratzer, W. B.: A spectroscopic study of the haemin–human-serum-albumin system. In: *Eur J Biochem*, Band 41(3):S. 539–546, 1974.
- Becker, Thomas, Vilsendorf, Andreas Meyer Zu, Terbish, Taivankhuu, Klempnauer, Jürgen und Jörns, Anne: Induction of heme oxygenase-1 improves the survival of pancreas grafts by prevention of pancreatitis after transplantation. In: *Transplantation*, Band 84(12):S. 1644–1655, 2007.
- Berk, P. D., Blaschke, T. F., Scharschmidt, B. F., Waggoner, J. G. und Berlin, N. I.: A new approach to quantitation of the various sources of bilirubin in man. In: *J Lab Clin Med*, Band 87(5):S. 767–780, 1976.

- Bosio, Andreas, Knörr, Constanze, Janssen, Uwe, Gebel, Stephan, Haussmann, Hans-Jürgen und Müller, Thomas: Kinetics of gene expression profiling in swiss 3t3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke. In: *Carcinogenesis*, Band 23(5):S. 741–748, 2002.
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem*, Band 72:S. 248–254, 1976.
- Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M. und Soares, M. P.: Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. In: *J Exp Med*, Band 192(7):S. 1015–1026, 2000.
- Brouard, Sophie, Berberat, Pascal O, Tobiasch, Edda, Seldon, Mark P, Bach, Fritz H und Soares, Miguel P: Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor nf-kappa b to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. In: *J Biol Chem*, Band 277(20):S. 17950–17961, 2002.
- Brown, S. D. und Piantadosi, C. A.: In vivo binding of carbon monoxide to cytochrome c oxidase in rat brain. In: *J Appl Physiol*, Band 68(2):S. 604–610, 1990.
- Brüne, B. und Ullrich, V.: Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. In: *Mol Pharmacol*, Band 32(4):S. 497–504, 1987.
- Cavallin-Stahl, E., Joensson, G. I. und Lundh, B.: A new method for determination of microsomal haem oxygenase (ec 1.14.99.3) based on quantitation of carbon monoxide formation. In: *Scand J Clin Lab Invest*, Band 38(1):S. 69–76, 1978.
- Chen, J. J., Crosby, J. S. und London, I. M.: Regulation of heme-regulated eif-2 alpha kinase and its expression in erythroid cells. In: *Biochimie*, Band 76(8):S. 761–769, 1994.
- Coburn, R. F., Blakemore, W. S. und Forster, R. E.: Endogenous carbon monoxide production in man. In: *J Clin Invest*, Band 42:S. 1172–1178, 1963.
- Cowell, I. G., Skinner, A. und Hurst, H. C.: Transcriptional repression by a novel member of the bzip family of transcription factors. In: *Mol Cell Biol*, Band 12(7):S. 3070–3077, 1992.
- DeBruyne, Jason P, Weaver, David R und Reppert, Steven M: Clock and npas2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. In: *Nat Neurosci*, Band 10(5):S. 543–545, 2007.

- Dioum, Elhadji M, Rutter, Jared, Tuckerman, Jason R, Gonzalez, Gonzalo, Gilles-Gonzalez, Marie-Alda und McKnight, Steven L: Npas2: a gas-responsive transcription factor. In: *Science*, Band 298(5602):S. 2385–2387, 2002.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. und Botstein, D.: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 95(25):S. 14863–14868, 1998.
- Ernst, A. und Zibrak, J. D.: Carbon monoxide poisoning. In: *N Engl J Med*, Band 339(22):S. 1603–1608, 1998.
- Evans, John P, Niemevz, Fernando, Buldain, Graciela und de Montellano, Paul Ortiz: Isoporphyrin intermediate in heme oxygenase catalysis. oxidation of alpha-meso-phenylheme. In: *J Biol Chem*, Band 283(28):S. 19530–19539, 2008.
- Ewing, Patricia, Hildebrandt, Gerhard C, Planke, Simone, Andreesen, Reinhard, Holler, Ernst und Gerbitz, Armin: Cobalt protoporphyrine ix-mediated heme oxygenase-i induction alters the inflammatory cytokine response, but not antigen presentation after experimental allogeneic bone marrow transplantation. In: *Int J Mol Med*, Band 20(3):S. 301–308, 2007.
- Fahmy, Roger G, Dass, Crispin R, Sun, Lun-Quan, Chesterman, Colin N und Khachigian, Levon M: Transcription factor egr-1 supports fgf-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. In: *Nat Med*, Band 9(8):S. 1026–1032, 2003.
- Faller, Michael, Matsunaga, Michio, Yin, Sheng, Loo, Joseph A und Guo, Feng: Heme is involved in microrna processing. In: *Nat Struct Mol Biol*, Band 14(1):S. 23–29, 2007.
- Fu, Maofu, Wang, Chenguang, Li, Zhiping, Sakamaki, Toshiyuki und Pestell, Richard G: Minireview: Cyclin d1: normal and abnormal functions. In: *Endocrinology*, Band 145(12):S. 5439–5447, 2004.
- Furchgott, R. F. und Jothianandan, D.: Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic gmp: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. In: *Blood Vessels*, Band 28(1-3):S. 52–61, 1991.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S. und Weitz, C. J.: Role of the clock protein in the mammalian circadian mechanism. In: *Science*, Band 280(5369):S. 1564–1569, 1998.
- Gidari, A. S. und Levere, R. D.: Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. In: *Semin Hematol*, Band 14(2):S. 145–168, 1977.

- Gilles-Gonzalez, Marie-Alda und Gonzalez, Gonzalo: Signal transduction by heme-containing pas-domain proteins. In: *J Appl Physiol*, Band 96(2):S. 774–783, 2004.
- Hunt, Tim und Sassone-Corsi, Paolo: Riding tandem: circadian clocks and the cell cycle. In: *Cell*, Band 129(3):S. 461–464, 2007.
- Ignarro, L. J., Degnan, J. N., Baricos, W. H., Kadowitz, P. J. und Wolin, M. S.: Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. In: *Biochim Biophys Acta*, Band 718(1):S. 49–59, 1982.
- Ikushima, S., Inukai, T., Inaba, T., Nimer, S. D., Cleveland, J. L. und Look, A. T.: Pivotal role for the nfil3/e4bp4 transcription factor in interleukin 3-mediated survival of pro-b lymphocytes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 94(6):S. 2609–2614, 1997.
- Immenschuh, S. und Ramadori, G.: Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. In: *Biochem Pharmacol*, Band 60(8):S. 1121–1128, 2000.
- Jin, Yang und Choi, Augustine M K: Cytoprotection of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung injury. In: *Proc Am Thorac Soc*, Band 2(3):S. 232–235, 2005.
- Kaasik, Krista und Lee, Cheng Chi: Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. In: *Nature*, Band 430(6998):S. 467–471, 2004.
- Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. und Shemin, D.: The enzymatic synthesis of delta-aminolevulinic acid. In: *J Biol Chem*, Band 233(5):S. 1214–1219, 1958.
- Kim, Hoe Suk, Loughran, Patricia A, Kim, Peter K, Billiar, Timothy R und Zuckerman, Brian S: Carbon monoxide protects hepatocytes from tnf-alpha/actinomycin d by inhibition of the caspase-8-mediated apoptotic pathway. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 344(4):S. 1172–1178, 2006a.
- Kim, Hong Pyo, Ryter, Stefan W und Choi, Augustine M K: Co as a cellular signaling molecule. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Band 46:S. 411–449, 2006b.
- Kinderlerer, Anne R, Gregoire, Isabel Pombo, Hamdulay, Shahir S, Ali, Faisal, Steinberg, Rivka, Silva, Gabriela, Ali, Nadira, Wang, Bufei, Haskard, Dorian O, Soares, Miguel P und Mason, Justin C: Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor. a role for increased bilirubin and ferritin. In: *Blood*, 2008.
- Kohmoto, J., Nakao, A., Stolz, D. B., Kaizu, T., Tsung, A., Ikeda, A., Shimizu, H., Takahashi, T., Tomiyama, K., Sugimoto, R., Choi, A. M K, Billiar, T. R., Murase, N. und McCurry, K. R.: Carbon monoxide protects rat lung transplants from



- ischemia-reperfusion injury via a mechanism involving p38 mapk pathway. In: *Am J Transplant*, Band 7(10):S. 2279–2290, 2007.
- Kotsch, K., Francuski, M., Pascher, A., Klemz, R., Seifert, M., Mittler, J., Schumacher, G., Buelow, R., Volk, H-D., Tullius, S. G., Neuhaus, P. und Pratschke, J.: Improved long-term graft survival after ho-1 induction in brain-dead donors. In: *Am J Transplant*, Band 6(3):S. 477–486, 2006.
- Kotsch, Katja, Martins, Paulo N A, Klemz, Roman, Janssen, Uwe, Gerstmayer, Bernhard, Dernier, Annelie, Reutzel-Selke, Anja, Kuckelkorn, Ulrike, Tullius, Stefan G und Volk, Hans-Dieter: Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. In: *Antioxid Redox Signal*, Band 9(12):S. 2049–2063, 2007.
- Kutty, R. K. und Maines, M. D.: Oxidation of heme c derivatives by purified heme oxygenase. evidence for the presence of one molecular species of heme oxygenase in the rat liver. In: *J Biol Chem*, Band 257(17):S. 9944–9952, 1982.
- Laitinen, J. T. und Juvonen, R. O.: A sensitive microassay reveals marked regional differences in the capacity of rat brain to generate carbon monoxide. In: *Brain Res*, Band 694(1-2):S. 246–252, 1995.
- Lathrop, J. T. und Timko, M. P.: Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. In: *Science*, Band 259(5094):S. 522–525, 1993.
- Lide, D. R. und Frederikse, H. P. R. (Hg.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Crc Press, Inc., Boca Raton, Fl, 76. Auflage, 1995.
- Loboda, Agnieszka, Jazwa, Agnieszka, Grochot-Przeczek, Anna, Rutkowski, Andrzej J, Cisowski, Jaroslaw, Agarwal, Anupam, Jozkowicz, Alicja und Dulak, Jozef: Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. In: *Antioxid Redox Signal*, Band 10(10):S. 1767–1812, 2008.
- Maines, M. D. und Kappas, A.: Cobalt stimulation of heme degradation in the liver. dissociation of microsomal oxidation of heme from cytochrome p-450. In: *J Biol Chem*, Band 250(11):S. 4171–4177, 1975.
- Maines, M. D. und Sinclair, P.: Cobalt regulation of heme synthesis and degradation in avian embryo liver cell culture. In: *J Biol Chem*, Band 252(1):S. 219–223, 1977.
- Maines, M. D., Trakshel, G. M. und Kutty, R. K.: Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. only one molecular species of the enzyme is inducible. In: *J Biol Chem*, Band 261(1):S. 411–419, 1986.
- Maines, Mahin D: *Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions*. CCR Press, U. of Rochester School of Med., 1992.

- Maines, Mahin D: The heme oxygenase system: update 2005. In: *Antioxid Redox Signal*, Band 7(11-12):S. 1761–1766, 2005.
- Maniatis, G. M., Ramirez, F., Cann, A., Marks, P. A. und Bank, A.: Translation and stability of human globin mrna in xenopus oocytes. In: *J Clin Invest*, Band 58(6):S. 1419–1427, 1976.
- Mashreghi, Mir-Farzin, Klemz, Roman, Knosalla, Isabela Schmitt, Gerstmayer, Bernhard, Janssen, Uwe, Buelow, Roland, Jozkowicz, Alicja, Dulak, Jozef, Volk, Hans-Dieter und Kotsch, Katja: Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of stat3. In: *J Immunol*, Band 180(12):S. 7919–7930, 2008.
- McCoubrey, W. K., Huang, T. J. und Maines, M. D.: Isolation and characterization of a cdna from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. In: *Eur J Biochem*, Band 247(2):S. 725–732, 1997.
- Morita, T., Mitsialis, S. A., Koike, H., Liu, Y. und Kourembanas, S.: Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. In: *J Biol Chem*, Band 272(52):S. 32804–32809, 1997.
- Morse, Danielle und Choi, Augustine M K: Heme oxygenase-1: from bench to bedside. In: *Am J Respir Crit Care Med*, Band 172(6):S. 660–670, 2005.
- Morse, Danielle, Pischke, Soeren E, Zhou, Zhihong, Davis, Roger J, Flavell, Richard A, Loop, Torsten, Otterbein, Sherrie L, Otterbein, Leo E und Choi, Augustine M K: Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the jnk pathway and ap-1. In: *J Biol Chem*, Band 278(39):S. 36993–36998, 2003.
- Nath, K. A., Balla, G., Vercellotti, G. M., Balla, J., Jacob, H. S., Levitt, M. D. und Rosenberg, M. E.: Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. In: *J Clin Invest*, Band 90(1):S. 267–270, 1992.
- Noguchi, M., Yoshida, T. und Kikuchi, G.: Identification of the product of heme degradation catalyzed by the heme oxygenase system as biliverdin ix alpha by reversed-phase high-performance liquid chromatography. In: *J Biochem*, Band 91(5):S. 1479–1483, 1982.
- Ohno, Tomoya, Onishi, Yoshiaki und Ishida, Norio: A novel e4bp4 element drives circadian expression of mperiod2. In: *Nucleic Acids Res*, Band 35(2):S. 648–655, 2007.
- Okamura, H.: Suprachiasmatic nucleus clock time in the mammalian circadian system. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Band 72:S. 551–556, 2007.

- Onishi, S., Itoh, S., Kawade, N., Isobe, K. und Sugiyama, S.: An accurate and sensitive analysis by high-pressure liquid chromatography of conjugated and unconjugated bilirubin ix-alpha in various biological fluids. In: *Biochem J*, Band 185(1):S. 281–284, 1980.
- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Lu, H. Tao, Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A. und Choi, A. M.: Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. In: *Nat Med*, Band 6(4):S. 422–428, 2000.
- Otterbein, L. E., Kolls, J. K., Mantell, L. L., Cook, J. L., Alam, J. und Choi, A. M.: Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. In: *J Clin Invest*, Band 103(7):S. 1047–1054, 1999a.
- Otterbein, L. E., Mantell, L. L. und Choi, A. M.: Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. In: *Am J Physiol*, Band 276(4 Pt 1):S. L688–L694, 1999b.
- Otterbein, Leo E, Soares, Miguel P, Yamashita, Kenichiro und Bach, Fritz H: Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. In: *Trends Immunol*, Band 24(8):S. 449–455, 2003.
- Pae, Hyun-Ock, Oh, Gi-Su, Choi, Byung-Min, Chae, Soo-Cheon und Chung, Hun-Taeg: Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in cd25- and cd25+ subsets of human cd4+ t cells. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 306(3):S. 701–705, 2003.
- Panda, Satchidananda, Antoch, Marina P, Miller, Brooke H, Su, Andrew I, Schook, Andrew B, Straume, Marty, Schultz, Peter G, Kay, Steve A, Takahashi, Joseph S und Hogenesch, John B: Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. In: *Cell*, Band 109(3):S. 307–320, 2002.
- Ponka, P.: Cell biology of heme. In: *Am J Med Sci*, Band 318(4):S. 241–256, 1999.
- Poss, K. D. und Tonegawa, S.: Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 94(20):S. 10919–10924, 1997a.
- Poss, K. D. und Tonegawa, S.: Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 94(20):S. 10925–10930, 1997b.
- Raghuram, Srilatha, Stayrook, Keith R, Huang, Pengxiang, Rogers, Pamela M, Nosie, Amanda K, McClure, Don B, Burris, Lorri L, Khorasanizadeh, Sepideh, Burris, Thomas P und Rastinejad, Fraydoon: Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors rev-erbalpha and rev-erbbeta. In: *Nat Struct Mol Biol*, Band 14(12):S. 1207–1213, 2007.

- Ramos, K. S., Lin, H. und McGrath, J. J.: Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. In: *Biochem Pharmacol*, Band 38(8):S. 1368–1370, 1989.
- Reppert, Steven M und Weaver, David R: Coordination of circadian timing in mammals. In: *Nature*, Band 418(6901):S. 935–941, 2002.
- Roberts, Gary P, Youn, Hwan und Kerby, Robert L: Co-sensing mechanisms. In: *Microbiol Mol Biol Rev*, Band 68(3):S. 453–473, 2004.
- Rodkey, F. L., O’Neal, J. D., Collison, H. A. und Uddin, D. E.: Relative affinity of hemoglobin s and hemoglobin a for carbon monoxide and oxygen. In: *Clin Chem*, Band 20(1):S. 83–84, 1974.
- Rogers, Pamela M, Ying, Ling und Burris, Thomas P: Relationship between circadian oscillations of rev-erbalpha expression and intracellular levels of its ligand, heme. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 368(4):S. 955–958, 2008.
- Rubio, María Fernanda, Agostino, Patricia V, Ferreyra, Gabriela A und Golombek, Diego A: Circadian heme oxygenase activity in the hamster suprachiasmatic nuclei. In: *Neurosci Lett*, Band 353(1):S. 9–12, 2003.
- Ryter, S., Kvam, E., Richman, L., Hartmann, F. und Tyrrell, R. M.: A chromatographic assay for heme oxygenase activity in cultured human cells: application to artificial heme oxygenase overexpression. In: *Free Radic Biol Med*, Band 24(6):S. 959–971, 1998.
- Ryter, Stefan W, Alam, Jawed und Choi, Augustine M K: Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. In: *Physiol Rev*, Band 86(2):S. 583–650, 2006.
- Ryter, Stefan W und Choi, Augustine M K: Cytoprotective and anti-inflammatory actions of carbon monoxide in organ injury and sepsis models. In: *Novartis Found Symp*, Band 280:S. 165–75; discussion 175–81, 2007.
- Ryter, Stefan W, Morse, Danielle und Choi, Augustine M K: Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. In: *Am J Respir Cell Mol Biol*, Band 36(2):S. 175–182, 2007.
- Sass, Gabriele, Soares, Miguel Che Parreira, Yamashita, Kenichiro, Seyfried, Stefan, Zimmermann, Wolfram-Hubertus, Eschenhagen, Thomas, Kaczmarek, Elzbieta, Ritter, Thomas, Volk, Hans-Dieter und Tiegs, Gisa: Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. In: *Hepatology*, Band 38(4):S. 909–918, 2003.

- Sato, K., Balla, J., Otterbein, L., Smith, R. N., Brouard, S., Lin, Y., Csizmadia, E., Seigny, J., Robson, S. C., Vercellotti, G., Choi, A. M., Bach, F. H. und Soares, M. P.: Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. In: *J Immunol*, Band 166(6):S. 4185–4194, 2001.
- Schacter, B. A.: Assay of microsomal heme oxygenase in liver and spleen. In: *Methods Enzymol*, Band 52:S. 367–372, 1978.
- Schibler, Ueli und Naef, Felix: Cellular oscillators: rhythmic gene expression and metabolism. In: *Curr Opin Cell Biol*, Band 17(2):S. 223–229, 2005.
- Schibler, Ueli und Sassone-Corsi, Paolo: A web of circadian pacemakers. In: *Cell*, Band 111(7):S. 919–922, 2002.
- Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A.: Molecular interaction between the strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. In: *J Mol Biol*, Band 255(5):S. 753–766, 1996.
- Schmittgen, Thomas D und Livak, Kenneth J: Analyzing real-time pcr data by the comparative c(t) method. In: *Nat Protoc*, Band 3(6):S. 1101–1108, 2008.
- Seglen, P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. In: *Methods Cell Biol*, Band 13:S. 29–83, 1976.
- Shan, Ying, Lambrecht, Richard W, Donohue, Susan E und Bonkovsky, Herbert L: Role of bach1 and nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. In: *FASEB J*, Band 20(14):S. 2651–2653, 2006.
- Sharma, Amar Deep, Cantz, Tobias, Richter, Rudolf, Eckert, Klaus, Henschler, Reinhard, Wilkens, Ludwig, Jochheim-Richter, Andrea, Arseniev, Lubomir und Ott, Michael: Human cord blood stem cells generate human cytokeratin 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. In: *Am J Pathol*, Band 167(2):S. 555–564, 2005.
- Shemin, D.: An illustration of the use of isotopes: the biosynthesis of porphyrins. In: *Bioessays*, Band 10(1):S. 30–35, 1989.
- Shemin, D. und Kikuchi, G.: Enzymatic synthesis of sigma-aminolevulinic acid. In: *Ann N Y Acad Sci*, Band 75(1):S. 122–128, 1958.
- Shemin, D. und Wittenberg, J.: The mechanism of porphyrin formation; the role of the tricarboxylic acid cycle. In: *J Biol Chem*, Band 192(1):S. 315–334, 1951.
- Sierra, E. E. und Nutter, L. M.: A microassay for heme oxygenase activity using thin-layer chromatography. In: *Anal Biochem*, Band 200(1):S. 27–30, 1992.

- Snyder, S. H., Jaffrey, S. R. und Zakhary, R.: Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. In: *Brain Res Brain Res Rev*, Band 26(2-3):S. 167–175, 1998.
- Song, Ruiping, Kubo, Masatoshi, Morse, Danielle, Zhou, Zhihong, Zhang, Xuchen, Dauber, James H, Fabisiak, James, Alber, Sean M, Watkins, Simon C, Zuckerbraun, Brian S, Otterbein, Leo E, Ning, Wen, Oury, Tim D, Lee, Patty J, McCurry, Kenneth R und Choi, Augustine M K: Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. In: *Am J Pathol*, Band 163(1):S. 231–242, 2003.
- Spivak, W. und Carey, M. C.: Reverse-phase h.p.l.c. separation, quantification and preparation of bilirubin and its conjugates from native bile. quantitative analysis of the intact tetrapyrroles based on h.p.l.c. of their ethyl anthranilate azo derivatives. In: *Biochem J*, Band 225(3):S. 787–805, 1985.
- Stangegaard, M., Dufva, I. H. und Dufva, M.: Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cdna. In: *Biotechniques*, Band 40(5):S. 649–657, 2006.
- Tenhunen, R.: Method for microassay of microsomal heme oxygenase activity. In: *Anal Biochem*, Band 45(2):S. 600–607, 1972.
- Tenhunen, R., Marver, H. S. und Schmid, R.: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 61(2):S. 748–755, 1968.
- Tenhunen, R., Marver, H. S. und Schmid, R.: Microsomal heme oxygenase. characterization of the enzyme. In: *J Biol Chem*, Band 244(23):S. 6388–6394, 1969.
- Tenhunen, R., Marver, H. S. und Schmid, R.: The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. In: *J Lab Clin Med*, Band 75(3):S. 410–421, 1970.
- Tsiftoglou, Asterios S, Tsamadou, Athina I und Papadopoulou, Lefkothea C: Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. In: *Pharmacol Ther*, Band 111(2):S. 327–345, 2006.
- Utz, J. und Ullrich, V.: Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. In: *Biochem Pharmacol*, Band 41(8):S. 1195–1201, 1991.
- Vanselow, Katja, Vanselow, Jens T, Westermarck, Pål O, Reischl, Silke, Maier, Bert, Korte, Thomas, Herrmann, Andreas, Herzel, Hanspeter, Schlosser, Andreas und Kramer, Achim: Differential effects of per2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (fasps). In: *Genes Dev*, Band 20(19):S. 2660–2672, 2006.

- Volti, Giovanni Li, Ientile, Riccardo, Abraham, Nader G, Vanella, Angelo, Cannavò, Giuseppe, Mazza, Francesco, Currò, Monica, Raciti, Giuseppina, Avola, Roberto und Campisi, Agata: Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 315(2):S. 517–524, 2004.
- Voss, S. und Skerra, A.: Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the strep-tag ii peptide and improved performance in recombinant protein purification. In: *Protein Eng*, Band 10(8):S. 975–982, 1997.
- Vreman, H. J. und Stevenson, D. K.: Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production. In: *Anal Biochem*, Band 168(1):S. 31–38, 1988.
- Wagener, Frank A D T G, Volk, Hans-Dieter, Willis, Dean, Abraham, Nader G, Soares, Miguel P, Adema, Gosse J und Figdor, Carl G: Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. In: *Pharmacol Rev*, Band 55(3):S. 551–571, 2003.
- Wilks, A., Black, S. M., Miller, W. L. und de Montellano, P. R. Ortiz: Expression and characterization of truncated human heme oxygenase (hho-1) and a fusion protein of hho-1 with human cytochrome p450 reductase. In: *Biochemistry*, Band 34(13):S. 4421–4427, 1995.
- Willis, D., Moore, A. R., Frederick, R. und Willoughby, D. A.: Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. In: *Nat Med*, Band 2(1):S. 87–90, 1996.
- Xia, Zhen-Wei, Zhong, Wen-Wei, Xu, Li-Qing, Sun, Jian-Le, Shen, Qing-Xiang, Wang, Ji-Guang, Shao, Jie, Li, Yun-Zhu und Yu, Shan-Chang: Heme oxygenase-1-mediated cd4+cd25high regulatory t cells suppress allergic airway inflammation. In: *J Immunol*, Band 177(9):S. 5936–5945, 2006.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y. und Koizumi, S.: Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. In: *J Clin Invest*, Band 103(1):S. 129–135, 1999.
- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G. T. und Okamura, H.: Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. In: *Science*, Band 292(5515):S. 278–281, 2001.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S. und Okamura, H.: Role of dbp in the circadian oscillatory mechanism. In: *Mol Cell Biol*, Band 20(13):S. 4773–4781, 2000.

- Yamamoto, Takuro, Nakahata, Yasukazu, Soma, Haruhiko, Akashi, Makoto, Mamine, Takayoshi und Takumi, Toru: Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. In: *BMC Mol Biol*, Band 5:S. 18, 2004.
- Yan, Jun, Wang, Haifang, Liu, Yuting und Shao, Chunxuan: Analysis of gene regulatory networks in the mammalian circadian rhythm. In: *PLoS Comput Biol*, Band 4(10):S. e1000193, 2008.
- Yang, Jianhua, Kim, Kevin D, Lucas, Andrew, Drahos, Karen E, Santos, Carlo S, Mury, Sean P, Capelluto, Daniel G S und Finkielstein, Carla V: A novel heme-regulatory motif mediates heme-dependent degradation of the circadian factor period 2. In: *Mol Cell Biol*, Band 28(15):S. 4697–4711, 2008.
- Yet, S. F., Perrella, M. A., Layne, M. D., Hsieh, C. M., Maemura, K., Kobzik, L., Wiesel, P., Christou, H., Kourembanas, S. und Lee, M. E.: Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. In: *J Clin Invest*, Band 103(8):S. R23–R29, 1999.
- Yin, Lei, Wu, Nan, Curtin, Joshua C, Qatanani, Mohammed, Szweggold, Nava R, Reid, Robert A, Waitt, Gregory M, Parks, Derek J, Pearce, Kenneth H, Wisely, G. Bruce und Lazar, Mitchell A: Rev-erb $\alpha$ , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. In: *Science*, 2007.
- Zenke-Kawasaki, Yukari, Dohi, Yoshihiro, Katoh, Yasutake, Ikura, Tsuyoshi, Ikura, Masae, Asahara, Toshimasa, Tokunaga, Fuminori, Iwai, Kazuhiro und Igarashi, Kazuhiko: Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor bach1. In: *Mol Cell Biol*, Band 27(19):S. 6962–6971, 2007.
- Zhang, L. und Guarente, L.: Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. In: *EMBO J*, Band 14(2):S. 313–320, 1995.
- Zhu, Y., Hon, T. und Zhang, L.: Heme initiates changes in the expression of a wide array of genes during the early erythroid differentiation stage. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 258(1):S. 87–93, 1999.



# Anhang A

## A.1 Verwendete Materialien

**Tab. A.1: Puffer und Lösungen**

Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen, die selbst angesetzt wurden. Kommerziell erhältliche Puffer sind in Material und Methoden (2, S. 22) mit der Firmenherkunft beschrieben.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Puffer A (Hepatozytenisolation)	5,36 mM KCl 0,44 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,17 mM NaHCO <sub>3</sub> 138 mM NaCl 0,38 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 5 mM Glucose 0,5 mM EGTA 50 mM Hepes pH 7,35, mit 4 M NaOH eingestellt sterilfiltriert
Puffer B (Hepatozytenisolation)	5,36 mM KCl 0,77 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,93 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,38 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 10 mM Hepes 138 mM NaCl 0,44 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tab. A.1: Puffer und Lösungen (fortgesetzt)

Bezeichnung	Zusammensetzung
	10 mM Glucose 2 mM CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 30 µM BSA 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin pH 7,4 sterilfiltriert frisch versetzt mit 0,3 mg/ml Collagenase IV (0,05 U/mg) 0,012 % (v/v) DNase
Protein-Lysispuffer	100 mM Tris-HCl 0,1 % (v/v) Triton-X 100 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)
RNA-Lysispuffer (Stratagene)	Zusammensetzung unbekannt versetzt mit 100 mM Mercaptoethanol

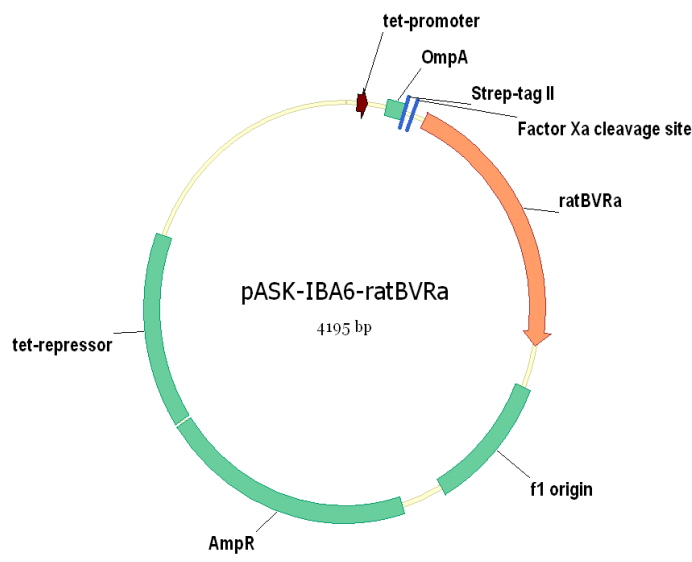
Tab. A.2: SYBR-Green-Primer für Real-Time RT-PCR

Spezies	Gen	Richtung	Sequenz in 5'–3'Richtung
Maus	mHo-1	Sense	CAGAAGAAGCTAAGACCGCCTT
		Antisense	TCTGGTCTTTGTGTTCCCTCTGTCA
	mE4bp4	Sense	AGAAACTCAGTAATTCCACAGCTGTCT
		Antisense	GCTCATGCTCGTCCACAAAAG
	mEgr1	Sense	AGCCGAGCGAACAACCCTA
		Antisense	CTCCACCATCGCCTTCTCAT
	mCnd1	Sense	GCCGAGAAGTTGTGCATCTACA
		Antisense	CGGCCAGGTTCCACTTGA
	mHpvt1	Sense	ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA
		Antisense	TTGAGCACACAGAGGGCCA
Mensch	hHo-1	Sense	GAAGAGGCCAGGACTGCGTTC
		Antisense	TGGTCCTTGGTGTTCATGGGT
	hHpvt1	Sense	ATGCTGGCTTATATCCAACACTTTCG
		Antisense	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG

# Anhang B

## B.1 Expressionsplasmid für rekombinante Ratten BVR

### B.1.1 Vektorkarte pASK-IBA6-rBVR



**Abb. B.1: pASK-IBA6-rBVR**  
Vektorkarte des bakteriellen Expressionsplasmids zur Generierung von rekombinanter Ratten BVR.

### B.1.2 Sequenz pASK-IBA6-rBVR

MOLECULE	pASK-IBA6-rBVR	4195 bp	DNA	circular
FEATURES	Location/Qualifiers			
gene	277..1164			
	/label=ratBVra			
promoter	37..72			
	/label=tet-promoter			
misc_feature	139..201			

```

                                /label=OmpA
misc_feature                   202..231
                                /label=Strep-tagII
misc_feature                   232..243
                                /label=Factor Xa cleavage site
misc_feature                   1306..1744
                                /label=f1 origin
misc_feature                   1893..2753
                                /label=AmpR
misc_feature                   2763..3386
                                /label=tet-repressor

```

ORIGIN

```

1      ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt
61     tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagtctg acaaaaatct
121    agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgcgga ttgcagtggc actggctggg
181    ttcgctaccg tagcgccaggc cgctagctgg agccacccgc agttcgaaaa aatcgaaggg
241    cgccgagacc gcggtcccga attcgagctc ggtaccatgg atgccgagcc aaagaggaaa
301    tttggagtgg tagtggttgg tgttggcaga gctggctcgg tgaggctgag ggacttgaag
361    gatccacgct ctgcagcatt cctgaacctg attggatttg tgtccagacg agagcttggg
421    agccttgatg aagtacggca gatttctttg gaagatgctc tccgaagcca agagattgat
481    gtcgcctata tttgcagtga gagtccagc catgaagact atatacggca gtttctgcag
541    gctggcaagc atgtcctcgt ggaatacccc atgacactgt catttgcggc ggcccaggag
601    ctgtgggagc tggccgcaca gaaagggaga gtccctgcag aggagcacgt ggaactcttg
661    atggaggaat tcgaattcct gagaagagaa gtgttgggga aagagctact gaaagggtct
721    cttcgcttca cagctagccc actggaagaa gagagatttg gcttccctgc gttcagcggc
781    atttctcgcc tgacctggct ggtctccctc ttcggggagc tttctcttat ttctgccacc
841    ttggaagagc gaaaagagga tcagtatatg aaaatgaccg tgcagctgga gaccagaac
901    aagggtctgc tgtcatggat tgaagagaaa gggcctggct taaaaagaaa cagatatgta
961    aacttccagt tcacttctgg gtccctggag gaagtgccaa gtgtaggggg caataagaac
1021   attttcttga aagatcagga tatatttgtt cagaagctct tagaccagggt ctctgcagag
1081   gacctggctg ctgagaagaa gcgcatcatg cattgcctgg ggctggccag cgacatccag
1141   aagctttgcc accagaagaa gtgaagagga agctctcgag gtcgacctgc agggggacca
1201   tggctcttga tatctaacta agcttgacct gtgaagtga aaatggcgca cattgtgcga
1261   catttttttt gtctgccgtt taccgctact gcgtcacgga tctccacgcg ccctgtagcg
1321   gcgcattaag cgcggcgggt gtggtgggta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg
1381   ccctagcgcc cgctccttcc gcttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc
1441   cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt taggggttccg atttagtgct ttacggcacc
1501   tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga
1561   cggtttttgc ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa
1621   ctggaacaac actcaaccct atctcggctc attcttttga tttataagggt attttgccga
1681   tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttaacaaaa atttaacgag aattttaaca
1741   aaatatatac gcttacaatt tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta
1801   tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat
1861   aaatgcttca ataataatga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc
1921   ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga
1981   aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca

```

2041 acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt  
 2101 ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg  
 2161 gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc  
 2221 atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata  
 2281 acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt  
 2341 tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag  
 2401 ccataccaa cgacgagcgt gacaccacga tgccctgtagc aatggcaaca acgttgcgca  
 2461 aactattaac tggcgaaacta cttactctag cttcccggca acaattgata gactggatgg  
 2521 aggcgggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg  
 2581 ctgataaatc tggagccggt gagcgtggct ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag  
 2641 atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gtagtcaggca actatggatg  
 2701 aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taggaattaa  
 2761 tgatgtctcg tttagataaa agtaaagtga ttaacagcgc attagagctg cttaatgagg  
 2821 tcggaatcga aggtttaaca acccgtaaac tcgcccagaa gctaggtgta gagcagccta  
 2881 cattgtattg gcatgtaaaa aataagcggg ctttgctcga cgccttagcc attgagatgt  
 2941 tagataggca ccatactcac ttttgccctt tagaagggga aagctggcaa gattttttac  
 3001 gtaataacgc taaaagtttt agatgtgctt tactaagtca tcgcatggga gcaaaagtac  
 3061 atttaggtac acggcctaca gaaaaacagt atgaaactct cgaaaatcaa ttagcctttt  
 3121 tatgccaaca aggtttttca ctagagaatg cattatatgc actcagcgca gtggggcatt  
 3181 ttacttttagg ttgcgtattg gaagatcaag agcatcaagt cgctaaagaa gaaagggaaa  
 3241 cacctactac tgatagtatg ccgccattat tacgacaagc tatcgaatta tttgatcacc  
 3301 aaggtgcaga gccagccttc ttattcggcc ttgaattgat catatgcgga ttagaaaaac  
 3361 aacttaaatg tgaaagtggg tcttaaaagc agcataacct ttttccgtga tggttaacttc  
 3421 actagtttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt  
 3481 aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt  
 3541 gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag  
 3601 cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca  
 3661 gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca  
 3721 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg  
 3781 ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg  
 3841 cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct  
 3901 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga  
 3961 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc  
 4021 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg  
 4081 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg  
 4141 cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgacc cgaca

## B.2 Expressionsplasmid für rekombinante verkürzte humane HO-1

### B.2.1 Vektorkarte pASK-IBA6-hHO-1-trunc

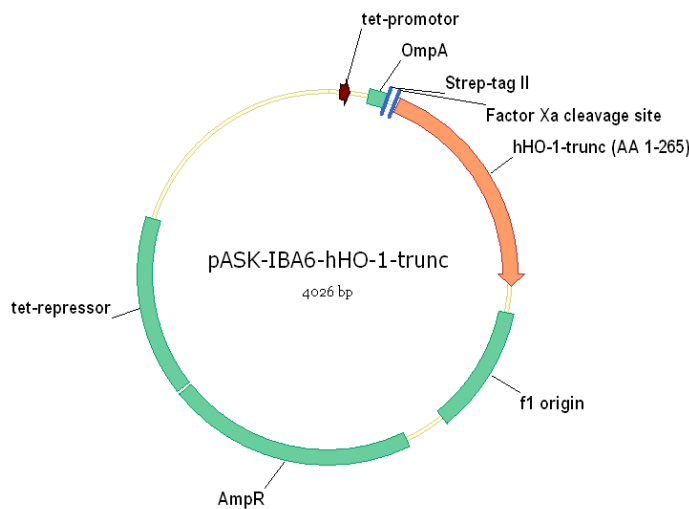


Abb. B.2: pASK-IBA6-hHO-1-trunc

Vektorkarte des bakteriellen Expressionsplasmids zur Generierung von rekombinanter verkürzter humaner HO-1 (AS 1 - 265).

### B.2.2 Sequenz pASK-IBA6-hHO-1-trunc

MOLECULE	pASK-IBA6-hHO-1-trunc	4026 bp	DNA	circular
FEATURES	Location/Qualifiers			
promoter	37..72			
	/label=tet-promotor			
misc_feature	139..201			
	/label=OmpA			
misc_feature	202..231			
	/label=Strep-tag II			
misc_feature	232..243			
	/label=Factor Xa cleavage site			
gene	244..1041			
	/label=HO-1-trunc (AA 1-265)			
misc_feature	1137..1575			
	/label=f1 origin			
misc_feature	1724..2584			
	/label=AmpR			
misc_feature	2594..3217			
	/label=tet-repressor			
ORIGIN				
1	ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt			

```

61   tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagtctg acaaaaatct
121  agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgcga ttgcagtggc actggctggt
181  ttcgctaccg tagcgcaggc cgctagctgg agccaccgcg agttcgaata aatcgaaggg
241  cgcattggagc gtccgcaacc cgacagcatg ccccaggatt tgtcagaggc cctgaaggag
301  gccaccaagg aggtgcacac ccaggcagag aatgctgagt tcatgaggaa ctttcagaag
361  ggccagggtga cccgagacgg cttcaagctg gtgatggcct ccctgtacca catctatgtg
421  gccctggagg aggagattga gcgcaacaag gagagcccag tcttcgcccc tgtctacttc
481  ccagaagagc tgcaccgcaa ggctgccctg gagcaggacc tggccttctg gtacgggccc
541  cgctggcagg aggtcatccc ctacacacca gccatgcagc gctatgtgaa gcggctccac
601  gaggtggggc gcacagagcc cgagctgctg gtggccacag cctacaccgc ctacctgggt
661  gacctgtctg ggggccagggt gctcaaaaag attgcccaga aagccctgga cctgcccagc
721  tctggcgagg gcctggcctt cttcaccttc cccaacattg ccagtgcac caagttaag
781  cagctctacc gctcccgcat gaactccctg gagatgactc ccgcagtcag gcagagggtg
841  atagaagagg ccaagactgc gttcctgctc aacatccagc tctttgagga gttgcaggag
901  ctgctgaccc atgacaccaa ggaccagagc ccctcacggg caccagggtc tcgccagcgg
961  gccagcaaca aagtgaaga ttctgcccc gtggagactc ccagagggaa gccccactc
1021 aacaccgcgt cccaggcttg atatctaact aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc
1081 acattgtgcg acattttttt tgtctgccgt ttaccgctac tgcgtcacgg atctccacgc
1141 gccctgtagc ggcgcatata gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac
1201 acttgccagc gccctagcgc cgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccagctt
1261 cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc
1321 tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat gggttcacgta gtgggccatc
1381 gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact
1441 cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg
1501 gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc
1561 gaatttttaac aaaatattaa cgcttacaat ttcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg
1621 cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca
1681 ataaccctga taaatgctt aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt
1741 ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcaaccaga
1801 aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtggt gttacatcga
1861 actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat
1921 gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca
1981 agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt
2041 cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac
2101 catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcgaggagc cgaaggagct
2161 aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga
2221 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac
2281 aacgttgcg aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattgat
2341 agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg
2401 ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggc tctcgggta tcattgcagc
2461 actggggcca gatggttaag cctcccgtat cgtagtattc tacacgacgg ggagtcaggc
2521 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg
2581 gtaggaatta atgatgtctc gtttagataa aagtaaagtg attaacagcg cattagagct
2641 gcttaatgag gtcggaatcg aaggtttaac aaccgtaaa ctcgccaga agctaggtgt
2701 agagcagcct acattgtatt ggcatgtaaa aaataagcgg gctttgctcg acgccttagc
2761 cattgagatg ttagataggc accatactca cttttgccct ttagaagggg aaagctggca
2821 agatttttta cgtaataacg ctaaaagttt tagatgtgct ttactaagtc atcgcgatgg

```

```

2881 agcaaaagta catttaggta cacggcctac agaaaaacag tatgaaactc tcgaaaatca
2941 attagccttt ttatgccaac aaggtttttc actagagaat gcattatatg cactcagcgc
3001 agtggggcat tttacttttag gttgcgtatt ggaagatcaa gagcatcaag tcgctaaaga
3061 agaaagggaa acacctacta ctgatagtat gccgccatta ttacgacaag ctatcgaatt
3121 atttgatcac caaggtgcag agccagcctt cttattcggc cttgaattga tcatatgcgg
3181 attagaaaaa caacttaaat gtgaaagtgg gtcttaaaag cagcataacc tttttccgtg
3241 atggtaactt cactagttta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac
3301 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa
3361 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc
3421 accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt
3481 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg
3541 ccaccacttc aagaactctg tagcacgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc
3601 agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt
3661 accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga
3721 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct
3781 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg
3841 cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca
3901 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa
3961 cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctacatgac
4021 ccgaca

```



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an dem, von Prof. Hans-Dieter Volk geleiteten, Institut für Medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Katja Kotsch angefertigt.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Hans-Dieter Volk dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, eine Doktorarbeit auf diesem hochinteressanten Thema anzufertigen. Vielen Dank für die langjährige, unterstützende Betreuung und für alles was ich an Deinem Institut für meine wissenschaftliche Ausbildung lernen durfte.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Katja Kotsch bedanken, die immer an mich geglaubt hat, und mich auch in schwierigen Zeiten wieder aufgebaut hat. Liebe Katja, Du hast es immer wieder geschafft, dass etwas von Deinen Ehrgeiz auf mich übertragen wurde, und ich somit bis zum Ende durchgehalten habe. An dieser Stelle bedanke ich mich auch an allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, darunter Mir Farzin Mashregi, der mir ein hilfsbereiter Freund und Kollege war, und besonders Diana Stauch und Annelie Dernier, die mir jederzeit seelisch und mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke Prof. Claudia Spies, die mir die Möglichkeit gegeben hat, in ihrer Klinik meine Arbeit weiterzuführen und schließlich zu beenden.

Des weiteren danke ich Prof. Peter-Michael Kloetzel.

Ich danke Dr. Stefan Hetz vom Institut für Tierphysiologie der Humboldt-Universität zu Berlin für die Leihgabe der wertvollen Wösthoff-Pumpen, ohne die ich die CO-Begasung von Zellkulturen nicht hätte durchführen können. Außerdem danke ich Philipp Wenzel von der II. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Ohren der HO-1-Knockout Mäuse.

Ein großer Dank gilt Prof. Achim Kramer, der mir bei den chronobiologischen Fragestellungen mit viel Diskussionsfreude, Ratschlägen und auch methodischer Unterstützung geholfen hat.

Ganz besonders danke ich Sabrina, da sie mir die Uhr erklärt hat. Außerdem hat sie mich durch die vielen Diskussionen sehr inspiriert. Sie hat mir bei vielen experimentellen Problemen zur Seite gestanden und hat mich immer wieder motivieren können, wenn ich schon fast aufgeben wollte.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir all die Jahre das Gefühl der Geborgenheit geben konnte und immer für mich da war.

# Publikationen

**Klemz R\***, Wendt S\*, Kotsch K, Kramer A. Role of HO-1 and carbon monoxide in the mammalian circadian oscillator. (*in Vorbereitung*)

**Klemz R**, Mashreghi MF, Spies C, Volk HD, Kotsch K. Amplifying the fluorescence of bilirubin enables the real-time detection of heme oxygenase activity. *Free Radic Biol Med.* **2009** Jan 15;46(2):305-11. Epub 2008 Nov 6.

Mashreghi MF, **Klemz R**, Knosalla IS, Gerstmayer B, Janssen U, Buelow R, Jozkowicz A, Dulak J, Volk HD, Kotsch K. Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of STAT3. *J Immunol.* **2008** Jun 15;180(12):7919-30.

Kotsch K, Martins PN, **Klemz R**, Janssen U, Gerstmayer B, Dernier A, Reutzel-Selke A, Kuckelkorn U, Tullius SG, Volk HD. Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. *Antioxid Redox Signal.* **2007** Dec;9(12):2049-63.

Weiss S, Kotsch K, Francuski M, Reutzel-Selke A, Mantouvalou L, **Klemz R**, Kuecuk O, Jonas S, Wesslau C, Ulrich F, Pascher A, Volk HD, Tullius SG, Neuhaus P, Pratschke J. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *Am J Transplant.* **2007** Jun;7(6):1584-93. Epub 2007 Apr 8.

Kotsch K, Francuski M, Pascher A, **Klemz R**, Seifert M, Mittler J, Schumacher G, Buelow R, Volk HD, Tullius SG, Neuhaus P, Pratschke J. Improved long-term graft survival after HO-1 induction in brain-dead donors. *Am J Transplant.* **2006** Mar;6(3):477-86.

Kuecuk O, Mantouvalou L, **Klemz R**, Kotsch K, Volk HD, Jonas S, Wesslau C, Tullius S, Neuhaus P, Pratschke J. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. *Transplant Proc.* **2005** Jan-Feb;37(1):387-8.

## Internationale Vorträge

Heme Oxygenases 2007, The 5th International Congress

5.–9. September 2007, Krakau, Polen

**Klemz R.** *Heme oxygenase activity: a new approach by fluorescent-based detection of bilirubin*

## Patente

Deutsche Patentanmeldung 10 2007 057 826.3

*Verfahren zur fluoreszenzbasierten Kinetikmessung der Hämoxygenaseaktivität*

Erfinder: **Klemz R.**, Mashregi MF, Kotsch K, Volk HD.

# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Mittel angefertigt habe.

Berlin, 4. Februar 2009

---